

BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND



Prioritätsbescheinigung über die Einreichung einer Patentanmeldung

Aktenzeichen:

101 23 133.4

Anmeldetag:

02. Mai 2001

Anmelder/Inhaber:

SCHERING AKTIENGESELLSCHAFT, Berlin/DE

Bezeichnung:

Rezeptor der ED_b-Fibronectin-Domäne (II)

IPC:

C 07 K, A 61 K, C 12 N

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 12. Oktober 2001
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag

A handwritten signature in black ink, consisting of a stylized 'h' followed by a horizontal line.

Rezeptor der ED_b-Fibronektin-Domäne (II)

Die Erfindung betrifft ein Protein, das spezifisch an die ED_b-Fibronektin-Domäne bindet.

5 Fibronektine sind eine wichtige Klasse von Matrix-Glykoproteinen. Ihre Hauptrolle besteht darin, das Anhaften von Zellen an eine Vielzahl verschiedener extrazellulärer Matrices zu ermöglichen. Das Vorhandensein von Fibronektinen auf der Oberfläche von nicht-transformierten Zellen in Kultur sowie deren Abwesenheit bei transformierten Zellen führte zur Identifizierung von Fibronektinen als wichtigen Adhäsionsproteinen. Sie wechselwirken mit zahlreichen verschiedenen anderen Molekülen, z. B. Collagen, Heparansulfat-Proteoglykanen und Fibrin, und regulieren damit die Zellform und den Aufbau des Zytoskeletts. Weiterhin sind sie verantwortlich für Zellmigration und Zelldifferenzierung während der Embryogenese. Sie sind außerdem wichtig für die Wundheilung, bei der sie die Wanderung von Makrophagen und anderen Immunzellen in das betroffene Gebiet ermöglichen, und bei der Bildung von Blutgerinnseln, indem sie das Anheften von Blutplättchen an beschädigte Regionen der Blutgefäße ermöglichen.

20 Fibronektine sind Dimere zweier ähnlicher Peptide, wobei jede Kette ungefähr 60 - 70 nm lang ist. Wenigstens 20 verschiedene Fibronektin-Ketten sind identifiziert worden, von denen alle durch alternatives Spleißen des RNA-Transkripts eines einzelnen Fibronektin-Gens erzeugt werden. Eine Analyse von proteolytischen Verdauen von Fibronektin zeigt, daß die Polypeptide aus sechs stark gefalteten Domänen bestehen, von denen jede Domäne wiederum sog. Wiederholungssequenzen („repeats“) enthält, deren Ähnlichkeiten hinsichtlich ihrer Aminosäuresequenz eine Klassifikation in drei Typen erlauben (Typ I, II, III). Die zentrale Region beider Ketten aus dem Dimer besteht aus einem Abschnitt von sog. Typ-III-Wiederholungen, die durchschnittlich 90 Aminosäuren lang sind (Kornblihtt AR, Vibe-Pedersen K und Baralle FE, 1983. Isolation and characterization of cDNA clones for human and bovine fibronectins. *Proc Natl Acad Sci USA*, 80, 3218-22). Strukturelle Studien haben ergeben, daß jede Typ-III-Wiederholung aus sieben beta-Strängen besteht, die in zwei antiparallele Faltblätter gefaltet sind, wobei kur-

ze Loop-Regionen als potentielle Protein-Protein-Wechselwirkungsstellen exponiert sind (Leahy DJ, Hendrickson WA, Aukhil I und Erickson HP. 1992. Structure of fibronectin type III domain from tenascin phased by MAD analysis of the selenomethionyl protein. *Science*, 258, 987-91). Diese Wiederholungen vom Typ III ermöglichen es, daß Fibronektine als Adhäsionsmoleküle fungieren, die mit Zelloberflächenmolekülen, den so. "Integrinen" interagieren. Der Begriff des Integrins wurde 1987 erstmals in einem Übersichtsartikel (Hynes R.O., 1987, *Cell* 48, 549-550) verwendet, um eine verwandte Gruppe von heterodimeren Zelloberflächenmolekülen zu beschreiben, die als Vermittler zwischen der extrazellulären Matrix und dem intrazellulären Cytoskelett fungieren und so die Zelladhäsion und Migration induzieren. Diese heterodimeren Rezeptoren „integrieren“, oder vermitteln also Signale vom extrazellulären Milieu mit spezifischen zellulären Funktionen. Bis heute sind 17 beta-Untereinheiten bekannt, die mit mehr als 20 alpha-Untereinheiten spezifisch und nicht-kovalent interagieren können, um so mehr als 20 verschiedene Familien zu bilden (Plow E. F. et al. 2000, *J Biol Chem*, 275, 21785-21788). Insbesondere vermittelt die Sequenz RGDS, die sich in der zehnten Wiederholung vom Typ III des Fibronektins befindet (III-10), die Wechselwirkung von Fibronektin mit wenigstens 8 verschiedenen Integrinen. Darüber hinaus wurde gezeigt, daß mindestens vier Integrine in einer RGDS-unabhängigen Weise spezifisch mit Fibronektin interagieren können (Plow E. F. et al. 2000, *J Biol Chem*, 275, 21785-21788). Die Gruppe der Wiederholungssequenzen vom Typ III umfaßt neben den III7-, III8-, III9- und III10-Sequenzen auch die Repeats EIIIB und EIIIA (ED_b und ED_a). Die Funktionen dieser beiden Wiederholungssequenzen sind bislang nicht oder nur zu einem geringen Maße verstanden. Eine Studie von Jarnagin W. et al. (Jarnagin W. Rockey D. Kotliansky V. Wang S. und Bissell D. 1994, Expression of variant fibronectins in wound healing: cellular source and biological activity of the EIIIA segment in rat hepatic fibrogenesis. *J Cell Biol*, 127, 2037-48) legt nahe, daß die ED_a-Domäne bei einer frühen Antwort der Leber auf eine Verletzung beteiligt ist, und weiterhin scheint die ED_a-Domäne beim Vermitteln von Zelladhäsionsvorgängen beteiligt zu sein. Eine Fibronektin-Isoform, die die ED_b-Sequenz (ED_b-FN oder ED-B oder EDB) enthält, ist in normalem Erwachsenenengewebe nicht nachweisbar, zeigt jedoch eine starke Expression in fötalem Gewebe sowie Tumorgewebe, ebenso wie auch während der Wundheilung.

Während der Entwicklung eines Tumors wird die extrazelluläre Matrix des Gewebes, in dem der Tumor wächst, durch proteolytischen Abbau bereits existierender Matrix-Bestandteile umgebaut. Hierbei entsteht eine tumorinduzierte extrazelluläre Matrix, die sich von der von normalen Geweben unterscheidet, eine geeignetere
5 Umgebung für das Tumorwachstum bietet und die Angiogenese fördert. Angiogenese ist einer der wichtigsten Vorgänge beim Tumorwachstum und bezeichnet den Prozeß, bei dem neue Gefäße aus existierenden Endothel-beschichteten Gefäßen hervorgehen. Angiogenese ist ein invasiver Prozeß, der eine Proteolyse der extrazellulären Matrix, Proliferation, gerichtete Wanderung und Differenzierung
10 von Endothelzellen in neue Kapillaren erfordert, die das Wachstum eines Tumors über eine bestimmte Größe hinaus unterstützen.

ED_b-Fibronectin ist mit dem Tumorwachstum in Verbindung gebracht worden. Weiterhin ist ED_b-FN um neue Blutgefäße während angiogener Vorgänge angereichert und stellt somit einen Marker für die Angiogenese bereit (Castellani P,
15 Viale G, Dorcaratto A, Nicolo G, Kaczmarek J, Querze G, Zardi L (1994) Int. J. Cancer 59:612-618).

Die ED_b-Domäne ist eine Wiederholungssequenz vom Typ III, umfassend 91 Aminosäuren, und weist eine extrem hohe Sequenzhomologie zwischen dem Ratten- und Hühner-Fibronectin auf, die zwischen 96 % und 100 % liegt. Innerhalb der
20 Domäne kommen keine RGDS- oder andere Aminosäuresequenzen vor, von denen bekannt ist, daß sie eine Interaktion mit Integrinen vermitteln. Die genaue
Funktion der ED-B -Domäne ist bis dato unbekannt. Drei Studien sind veröffentlicht worden, die Spekulationen über eine allgemeine fördernde Funktion hinsichtlich Adhäsion/Zellausbreitung für verschiedene Zellen anstellen.

25 Chen und Culp (1996), Exp. Cells Res. 223, 9-19, haben gezeigt, daß zelluläre Fibronektine die ED_b-Domäne und benachbarte Wiederholungssequenzen vom Typ III als u. U. adhäsionsfördernde Sequenzen enthalten, die von den Zellen durch alternatives Spleißen des primären Transkripts von Fibronectin reguliert werden können.

30 In einer späteren Studie (Chen und Culp, 1998, Clin. Exp. Metast., 16, 1, 30-42) konnte gezeigt werden, daß ED_b Zell-Signal-Ereignisse induziert, die zu einer Ty-

- rosin-Phosphorylierung von fokalen Adhäsionsproteinen führt, und zwar mit einem Mechanismus, der sich von demjenigen unterscheidet, der durch die Wiederholungssequenzen III8-9-10 vermittelt wird, welche Integrine erkennen. Es wird zunehmend anerkannt, daß die Zelladhäsion an extrazelluläre Matrices bzw. an andere Zellen eine wichtige Quelle für Zell-Signale ist, die für die Regulation vieler Phänomene verantwortlich ist, wie z. B. Zellwachstum, -differenzierung und -transformation. Ein Adhäsions-induziertes Signalgeben beinhaltet die Aktivierung von Protein-Tyrosin-Kinasen und eine Kaskade der Tyrosin-Phosphorylierung verschiedener Signal-Moleküle. Die Autoren der eben genannten Studie weisen darauf hin, daß für diesen Signalprozeß die 125 kDa fokale Adhäsionskinase (FAK) von zentraler Bedeutung ist, die die Zell-Wechselwirkung mit Matrix-Proteinen an die Aktivierung von intrazellulären Signalmolekülen verknüpft, wie etwa Src (Xing Z, Chen HC, Nowlen JK, Taylor SJ, Shalloway D und Guan JL, 1994, Direct interaction of v-Src with the focal adhesion kinase mediated by the Src SH2 domain. *Mol Biol Cell*. **5**, 413-21), Grb2 (Schlaepfer DD, Hanks SK, Hunter T und van der Geer P, 1994, Integrin-mediated signal transduction linked to Ras pathway by GRB2 binding to focal adhesion kinase. *Nature*, **372**, 786-91) und PI-3-Kinase (Chen HC und Guan JL, 1994, Association of focal adhesion kinase with its potential substrate phosphatidylinositol 3-kinase. *Proc Natl Acad Sci USA*, **91**, 10148-52). Von einem anderen fokalen Adhäsionsprotein p130cas wird ebenso angenommen, daß es bei Adhäsions-vermittelten Signalereignissen und bei spezifischen Onkogen-Aktivitäten beteiligt ist, obwohl seine genaue Funktion bisher nicht aufgeklärt ist (Sakai R, Iwamatsu A, Hirano N, et al. 1994, A novel signaling molecule, p130, forms stable complexes *in vivo* with v-Crk and c-Src in a tyrosine phosphorylation-dependent manner. *EMBO J*. **13**, 3748-56; Petch LA, Bockholt SM, Bouton A, Parsons JT und Burridge K, 1995, Adhesion-induced tyrosine phosphorylation of the p130 SRC substrate. *J Cell Sci*, **108**, 1371-9; Polte TR und Hanks SK, 1995, Interaction between focal adhesion kinase and Crk-associated tyrosine kinase substrate p130^{Cas}. *Proc Natl Acad Sci USA*, **92**, 10678-82).
- Die Studie von Chen und Culp (1998, aaO) zeigt, daß das Mono-Wiederholungs-Protein ED_b stärker fördernd war für die Ausbreitung von Balb/c 3T3-Zellen sowie für das Induzieren von FAK-Tyrosin-Phosphorylierung als die benachbarten Repeats III8 etc.. Es wird die Vermutung angestellt, daß bei physiologischen Kon-

zentrationen der zellulären Fibronectine die Bindung des Tetrapeptids RGDS aus III10 an die Integrine möglicherweise ein nicht hinreichend starkes Signal für die Zelladhäsion erzeugt, so daß es bei dem durch die Wechselwirkung zwischen III10 und Integrin-vermittelten Mechanismen zu keiner Tyrosin-Phosphorylierungs-

5 Antwort kommt. Es wird weiter vermutet, daß der Unterschied hinsichtlich der Antwort auf die unterschiedlichen vermittelten Zelladhäsionen durch eine unterschiedliche Aktivierung verschiedener kleiner GTP-bindender Proteine verursacht wird. Drei dieser Proteine, cdc42, rac und rho, die alle Mitglieder der ras-Superfamilie sind, spielen wichtige Rollen bei zell-morphologischen Veränderungen. cdc42 agiert sequenziell stromaufwärts von rac und induziert direkt das Er-
10 scheinen von Filopodien (Nobes CD und Hall A, 1995, Rho, rac, und cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia, *Cell*. **81**, 53-62). Die Aktivierung von rac ist dann verantwortlich für die Bildung von Lamellipodien und das Netzwerk von
15 Aktin-Filamenten zwischen den Filopodien. Weiter stromabwärts rho kann durch rac aktiviert werden und induziert fokale Adhäsionen und Aktin-Zugfasern. Alle diese Ereignisse sind abhängig von der Aktivierung von Tyrosin-Kinase, und von FAK wird angenommen, daß sie bei diesen Vorgängen beteiligt ist. Chen und Culp stellen die Vermutung an, daß die morphologischen Unterschiede zwischen Zel-
20 len, die über 7-ED_b-8 adhären sind, sowie Zellen, die über 8-9-10 adhären sind, auf der unterschiedlichen Aktivierung der kleinen GTP-bindenden Proteine beruht. Daraus wird gefolgert, daß eine Adhäsion über 8-9-10 über den Integrin-vermittelten Signalweg schließlich zu einer Aktivierung von rho führt, um fokale Adhäsionen und Aktin-Zugfasern zu erzeugen, während die Adhäsion von Balb/c-
25 3T3-Zellen über 7-ED_b-8 nur zu einer Aktivierung von cdc42- und rac-Proteinen führt, nicht jedoch rho aktiviert. Für die eben genannten Mutmaßungen werden jedoch in keiner der beiden Studien Daten präsentiert.

Eine andere Studie (Hashimoto-Uoshima et al., 1997, *J. Cell Sci.* **110**, 2271-2280) zeigt, daß die Zell-Adhäsion von kultivierten Fibroblasten durch die Anwesenheit
30 von Fibronectin-Fragmenten, die die ED_b-Fibronectin-Domäne einschließen, verstärkt wird. Daraus wird gefolgert, daß die gespleißte ED_b-Domäne eine wichtige biologische Funktion hinsichtlich der Verstärkung der Zell-Adhäsion und -ausbreitung haben kann. Demgegenüber verhindert der Einschluß von ED_a in

Fragmenten in Abwesenheit von ED_b die Ausbildung von guten fokalen Adhäsionen in Zellen. Darauf basierend, spekulieren die Autoren dieser Studie, daß der Einschluß beider Domänen im Fibronectin-Molekül einen Mechanismus darstellen kann, mit dem eine Zell-Adhäsion in dem Ausmaße erreicht wird, daß Fortbewegungsvorgänge erleichtert werden, bei denen sowohl Adhäsion als auch Verluste der Adhäsion für das Fortbewegen von Zellen benötigt wird.

Untersuchungen an Hühnerembryonen und erwachsenen Mäusen zeigten, daß ED_b-vermittelte Angiogenese durch Inhibition des Endothelzell-Integrins $\alpha 3 \beta 1$ blockiert werden kann (Renato et al., AACR 2001, LB-60).

10 Keine der genannten Studien und Untersuchungen ergibt jedoch eine klare Antwort hinsichtlich der Funktion der ED_b-Domäne, noch werden Aussagen getroffen über die Identität eines möglichen (möglicher) Rezeptors (Rezeptoren) für die ED_b-Domäne.

15 Es ist daher eine Aufgabe der vorliegenden Erfindung, die Funktion der ED_b-Domäne weiter aufzuklären. Es ist eine weitere Aufgabe der vorliegenden Erfindung, einen möglichen spezifischen Rezeptor für die ED_b-Domäne zu identifizieren. Es ist eine weitere Aufgabe der vorliegenden Erfindung, den ED_b-spezifischen Adhäsions-Mechanismus und die Wechselwirkung mit Rezeptormolekülen aufzuklären, die beim Prozeß der Angiogenese beteiligt sein könnten. Weiterhin ist es
20 eine Aufgabe der vorliegenden Erfindung, die für die spezifische Bindung verantwortliche ED_b-Region zu identifizieren.

Diese Aufgabe wird gelöst durch

ein Protein,

25 a) das die Fähigkeit aufweist, spezifisch an die ED_b-Fibronectin-Domäne zu binden;

b) das spezifisch in Endothelzellen exprimiert oder aktiviert ist;

- c) das spezifisch in stromalen Zellen eines Tumors exprimiert oder aktiviert ist;
 - d) das spezifisch in Tumorzellen exprimiert oder aktiviert ist;
 - e) dessen Bindung an die ED_b-Fibronectin-Domäne durch ein Polypeptid inhibiert wird; und
- 5 f) das ein apparentes Molekulargewicht von 120 – 130 kDa für die leichte Kette und 150 – 160 kDa für die schwere Kette, ermittelt durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese, aufweist.

Insbesondere bevorzugt ist ein Protein,

- a) das die Fähigkeit aufweist, spezifisch an die ED_b-Fibronectin-Domäne zu binden, wobei die Bindungsregion durch mindestens eine Sequenz charakterisiert ist, die ausgewählt ist aus der Gruppe, die SEQ ID NO:1 - 3 umfaßt;
- 10 b) das spezifisch in Endothelzellen exprimiert oder aktiviert ist;
- c) das spezifisch in stromalen Zellen eines Tumors exprimiert oder aktiviert ist;
 - d) das spezifisch in Tumorzellen exprimiert oder aktiviert ist;
- 15 e) dessen Bindung an die ED_b-Fibronectin-Domäne durch ein Polypeptid inhibiert wird, das eine Sequenz umfaßt, die ausgewählt ist aus der Gruppe, die SEQ ID NO:1 - 3 umfaßt; und

f) das ein apparentes Molekulargewicht von 120 – 130 kDa für die leichte Kette und 150 – 160 kDa für die schwere Kette, ermittelt durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese, aufweist.

Ganz besonders bevorzugt ist ein Protein,

5 a) das die Fähigkeit aufweist, spezifisch an die ED_b-Fibronectin-Domäne zu binden, und das die $\alpha 2\beta 1$ -Kette des Integrins umfaßt;

b) das spezifisch in Endothelzellen exprimiert oder aktiviert ist;

c) das spezifisch in stromalen Zellen eines Tumors exprimiert oder aktiviert ist;

d) das spezifisch in Tumorzellen exprimiert oder aktiviert ist;

10 e) dessen Bindung an die ED_b-Fibronectin-Domäne durch ein Polypeptid inhibiert wird, und das die α -Kette des Integrins umfaßt; und

f) das ein apparentes Molekulargewicht von 120 – 130 kDa für die leichte Kette und 150 – 160 kDa für die schwere Kette, ermittelt durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese, aufweist.

15 In einer bevorzugten Ausführungsform sind die Endothelzellen proliferierende Endothelzellen.

In einer bevorzugten Ausführungsform sind die stromalen Zellen Tumor-Stroma-Zellen.

Die Aufgabe wird außerdem gelöst durch ein Protein, dessen spezifische Bindung an die ED_b-Fibronectin-Domäne die Adhäsion von Endothelzellen, Tumor-Stromazellen und Tumorzellen vermittelt. Die Bindungsregion kann hier durch mindestens eine Sequenz charakterisiert sein, die ausgewählt ist aus der Gruppe, die

5 SEQ ID NO: 1 - 3 umfaßt und insbesondere die $\alpha 2\beta 1$ -Kette des Integrins umfaßt.

Die Aufgabe wird auch durch ein Protein gelöst, dessen spezifische Bindung an die ED_b-Fibronectin-Domäne die Proliferation von Endothelzellen induziert. Die Bindungsregion kann hier durch mindestens eine Sequenz charakterisiert sein, die ausgewählt ist aus der Gruppe, die SEQ ID NO: 1 - 3 umfaßt und insbesondere die $\alpha 2\beta 1$ -Kette des Integrins umfaßt.

10

Weiterhin wird die Aufgabe gelöst durch ein Protein, dessen spezifische Bindung an die ED_b-Fibronectin-Domäne die Proliferation, Migration und Differenzierung von Endothelzellen in eine Collagenmatrix induziert, wobei die Bindungsregion durch mindestens eine Sequenz charakterisiert ist. Die Bindungsregion kann hier durch mindestens eine Sequenz charakterisiert sein, die ausgewählt ist aus der Gruppe, die SEQ ID NO: 1 - 3 umfaßt und insbesondere die $\alpha 2\beta 1$ -Kette des Integrins umfaßt.

15

Die Aufgabe wird weiterhin gelöst durch ein Protein, das an die ED_b-Fibronectin-Domäne bindet und spezifische Signaltransduktionswege induziert, wobei mindestens ein Gen induziert wird, das für ein Protein codiert, das ausgewählt ist aus der Gruppe, die

20

Fokale Adhäsionskinase,

CD6-Ligand (ALCAM),

die α -Kette des Vitronektin-Rezeptors,

die integrierte alpha 8 Untereinheit und

einen/den Vorläufer für Follistatin-verwandtes Protein

umfaßt.

- 5 Die Bindungsregion kann hier durch mindestens eine Sequenz charakterisiert sein, die ausgewählt ist aus der Gruppe, die SEQ ID NO: 1 - 3 umfaßt und insbesondere die $\alpha 2\beta 1$ -Kette des Integrins umfaßt.

- Es wird bevorzugt, daß bei der Induktion spezifischer Signaltransduktionswege mindestens eines der genannten Gene mindestens einfach induziert wird. Bevorzugter wird dabei mindestens eines der genannten Gene zweifach induziert.
- 10

Die Aufgabe wird auch gelöst durch einen Antikörper, der in der Lage ist, an ein Protein gemäß der vorliegenden Erfindung zu binden.

- Weiterhin wird die Aufgabe gelöst durch einen Antikörper, der in der Lage ist, an ein Protein zu binden, das eine Aminosäuresequenz umfaßt, die aus der Gruppe ausgewählt ist, die SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3 und SEQ ID NO:4 umfaßt.
- 15

In einer bevorzugten Ausführungsform ist der Antikörper in der Lage, Effekte zu inhibieren, die für die ED_b-Domäne spezifisch sind.

- Es wird bevorzugt, daß die Bindung und Inhibierung in vitro und/oder in vivo erfolgt.
- 20

In einer bevorzugten Ausführungsform ist der Antikörper monoklonal oder rekombinant.

In einer bevorzugten Ausführungsform ist der Antikörper ein scFv-Fragment.

5 Die Aufgabe wird auch gelöst durch eine Zelle, die ein Protein gemäß der vorliegenden Erfindung exprimiert.

Weiterhin wird die Aufgabe gelöst durch eine Zelle, die einen Antikörper gemäß der vorliegenden Erfindung exprimiert.

Außerdem wird die Aufgabe durch einen Phagen gelöst, der einen Antikörper gemäß der vorliegenden Erfindung exprimiert.

10 Die Aufgabe wird auch gelöst durch ein Verfahren zum Screenen auf Verbindungen, die an einen Rezeptor der ED_b-Fibronectin-Domäne binden, wobei das Verfahren umfaßt:

15 Vergleich einer Antwort von Zellen in Anwesenheit von einer oder mehrerer dieser Verbindungen mit der Kontrollantwort besagter Zellen in Abwesenheit dieser Verbindungen, wobei die Zellen

ein Protein gemäß der vorliegenden Erfindung exprimieren oder

eine Nukleinsäure, die für dieses Protein codiert, umfassen, und

wobei die Antwort bzw. die Kontrollantwort durch einen Rezeptor der ED_b-Fibronectin-Domäne vermittelt wird.

In einer bevorzugten Ausführungsform umfaßt die Antwort bzw. die Kontrollantwort das Anhaften der Zellen an Oberflächen, die mit der ED_b-Fibronectin-Domäne oder Teilen davon beschichtet sind.

- 5 In einer bevorzugten Ausführungsform des Verfahrens umfaßt eine Bindungsregion der ED_b-Fibronectin-Domäne die Sequenzen SEQ ID NO:1 - 4 oder Teile davon.

Es wird bevorzugt, daß die Antwort bzw. die Kontrollantwort die Proliferation der Zellen an Oberflächen umfaßt, die mit der ED_b-Fibronectin-Domäne oder Teilen davon beschichtet sind.

- 10 In einer bevorzugten Ausführungsform umfaßt die Antwort bzw. die Kontrollantwort die Proliferation, Migration und Differenzierung von Endothelzellen in einer Collagenmatrix, die mit der ED_b-Fibronectin-Domäne oder Teilen davon versetzt wird.

- 15 Es ist bevorzugt, daß die Verbindungen ausgewählt sind aus der Gruppe, die Antikörper, Antikörperfragmente, artifizielle Antikörper, Peptide, niedermolekulare Verbindungen, Aptamere und Spiegelmere umfaßt.

- In einer bevorzugten Ausführungsform sind die Antikörper rekombinante Antikörper.

Es wird bevorzugt, daß die Antikörper ausgewählt sind aus der Gruppe, die scFv und Fragmente davon umfaßt.

- 20 Die Aufgabe wird ebenso gelöst durch ein Verfahren zum Screenen auf Verbindungen, die an die ED_b-Fibronectin-Domäne binden, wobei das Verfahren umfaßt:

a) In-Kontakt-Bringen von Zellen mit einer festgelegten Konzentration eines Proteins, das die ED_b-Fibronectin-Domäne oder ein Protein mit einer der in SEQ ID NO:1 – 4 dargestellten Sequenzen umfaßt, in der Anwesenheit verschiedener Konzentrationen von einer oder mehrerer der Verbindungen; und

- 5 b) Nachweisen von Unterschieden in der Antwort der Zellen auf das Protein, das die ED_b-Fibronectin-Domäne oder ein Protein mit einer der in SEQ ID NO:1 – 4 dargestellten Sequenzen umfaßt, in der Anwesenheit der Verbindungen im Vergleich mit der Kontrollantwort der Zellen auf das Protein, das die ED_b-Fibronectin-Domäne oder ein Protein mit einer der in SEQ ID NO:1 – 4 dargestellten Sequenzen umfaßt, in der Abwesenheit dieser Verbindungen, wobei

die Zellen ein Protein gemäß der vorliegenden Erfindung exprimieren oder

eine Nukleinsäure, die für dieses Protein codiert, umfassen, und

wobei die Antwort bzw. die Kontrollantwort durch einen Rezeptor der ED_b-Fibronectin-Domäne vermittelt wird.

- 15 Dabei ist bevorzugt, daß die Antwort bzw. die Kontrollantwort das Anhaften der Zellen an Oberflächen umfaßt, die mit der ED_b-Fibronectin-Domäne oder Teilen davon beschichtet sind.

Monoklonale Antikörper wurden mittels Standard-Methoden der Hybridomatechnologie hergestellt und immunhistologisch auf humanem Tumor-Cryoschnitten charakterisiert (s. Fig.13).

20 Exemplarisch: AK AM-EDBr-2 (murines IgG 1/kappa)

In einer bevorzugten Ausführungsform umfaßt die Antwort bzw. die Kontrollantwort die Proliferation der Zellen an Oberflächen, die mit der ED_b-Fibronectin-Domäne oder Teilen davon beschichtet sind.

- 5 In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform umfaßt die Antwort bzw. die Kontrollantwort die Proliferation, Migration und Differenzierung von Endothelzellen in einer Collagenmatrix, die mit der ED_b-Fibronectin-Domäne oder Teilen davon versetzt wird.

- 10 Es ist bevorzugt, daß die Verbindungen ausgewählt sind aus der Gruppe, die Antikörper, artifizielle Antikörper, Antikörperfragmente, Peptide, niedermolekulare Substanzen, Aptamere und Spiegelaptamere umfaßt.

- 15 Die Aufgabe wird weiterhin gelöst durch die Verwendung einer Nukleinsäure, die für ein Protein codiert, das eine Sequenz umfaßt, die ausgewählt ist aus der Gruppe, die SEQ ID NO: 1 – 4 umfaßt, zum Screenen auf Verbindungen, die an einen Rezeptor der ED_b-Fibronectin-Domäne oder die ED_b-Fibronectin-Domäne binden.

- Die Aufgabe wird auch gelöst durch die Verwendung eines Proteins gemäß der vorliegenden Erfindung bzw. eines Antikörpers gemäß der vorliegenden Erfindung zum Screenen auf Verbindungen, die an einen Rezeptor der ED_b-Fibronectin-Domäne oder die ED_b-Fibronectin-Domäne binden.

- 20 Ebenso gelöst wird die Aufgabe durch die Verwendung einer Zelle gemäß der vorliegenden Erfindung, zum Screenen auf Verbindungen, die an einen Rezeptor der ED_b-Fibronectin-Domäne oder die ED_b-Fibronectin-Domäne binden.

Die Aufgabe wird ebenso gelöst durch die Verwendung einer Nukleinsäure, die für ein Protein codiert, das eine Sequenz umfaßt, die ausgewählt ist aus der Gruppe,

die SEQ ID NO: 1 – 4 umfaßt, zum Entwickeln von Antikörpern oder scFv-Fusionsproteinen für diagnostische oder therapeutische Zwecke.

Die Aufgabe wird ebenso gelöst durch die Verwendung eines Proteins gemäß der vorliegenden Erfindung zum Entwickeln von Antikörpern oder scFv-Fusionsproteinen für diagnostische oder therapeutische Zwecke. Unter therapeutischem Zweck ist u. a. die anti-angiogene Behandlung mit Verbindungen, die die spezifische Interaktion zwischen ED_b und dem Rezeptor inhibieren, gemeint. Die Antikörper sind hierbei sowohl gegen den Rezeptor als auch gegen ED_b gerichtet, wobei die Peptide der Sequenz SEQ ID NO:1 - 3 und stabilisierte Derivate davon sowie niedermolekulare Verbindungen zur Anwendung kommen.

Die Aufgabe wird ebenso gelöst durch die Verwendung einer Zelle gemäß der vorliegenden Erfindung zum Entwickeln von Antikörpern oder scFv-Fusionsproteinen für diagnostische oder therapeutische Zwecke.

Die Aufgabe wird ebenso gelöst durch die Verwendung eines Phagen gemäß der vorliegenden Erfindung zum Entwickeln von Antikörpern oder scFv-Fusionsproteinen für diagnostische oder therapeutische Zwecke.

Die Aufgabe wird ebenso gelöst durch die Verwendung eines Proteins, das eine Sequenz umfaßt, die ausgewählt ist aus der Gruppe, die SEQ ID NO: 1 – 4 umfaßt, für eine pro-angiogene Therapie.

Die Aufgabe wird ebenso gelöst durch die Verwendung eines Proteins, das eine Sequenz umfaßt, die ausgewählt ist aus der Gruppe, die SEQ ID NO: 1 – 4 umfaßt, für diagnostische Zwecke.

Die Aufgabe wird ebenso gelöst durch die Verwendung eines Proteins, das eine Sequenz umfaßt, die ausgewählt ist aus der Gruppe, die SEQ ID NO: 1 – 4 umfaßt, in der Gentherapie.

Die Aufgabe wird ebenso gelöst durch die Verwendung eines Proteins, das eine Sequenz umfaßt, die ausgewählt ist aus der Gruppe, die SEQ ID NO: 1 – 4 umfaßt, zum Beschichten von Oberflächen, an die Endothelzellen binden.

Dabei ist bevorzugt, daß das Beschichten in vitro oder in vivo erfolgt.

- 5 Die Aufgabe wird ebenso gelöst durch die Verwendung eines Proteins, das eine Sequenz umfaßt, die ausgewählt ist aus der Gruppe, die SEQ ID NO: 1 – 4 umfaßt, in Zellkulturen.

- 10 Die Aufgabe wird ebenso gelöst durch die Verwendung eines Proteins, das eine Sequenz umfaßt, die ausgewählt ist aus der Gruppe, die SEQ ID NO: 1 – 4 umfaßt, zusammen mit mindestens einem Transplantat.

Dabei ist bevorzugt, daß das Transplantat ausgewählt ist aus der Gruppe, die Gefäß(e), Haut, Cornea, Nieren, Leber, Knochenmark, Herz, Lungen, Knochen, Thymus, Dünndarm, Pankreas, andere innere Organe sowie Teile und Zellen davon umfaßt.

- 15 Die Aufgabe wird ebenso gelöst durch die Verwendung eines Proteins, das eine Sequenz umfaßt, die ausgewählt ist aus der Gruppe, die SEQ ID NO: 1 – 4 umfaßt, zusammen mit mindestens einem Implantat.

- 20 Dabei ist bevorzugt, daß das Implantat ausgewählt ist aus der Gruppe, die Lungenimplantate, künstliche Herzschrittmacher, künstliche Herzklappen, Gefäßimplantate, Endoprothesen, Schrauben, Schienen, Platten, Drähte, Nägel, Stäbe, künstliche Gelenke, Mammainplantate, künstliche Schädelplatten, künstliche Zähne, Zahnfüllungen und Zahnbrücken umfaßt.

Unter „Effekten, die für die ED_b-Fibronektin-Domäne spezifisch sind“ werden alle solche Effekte verstanden, die durch die ED_b-Fibronektin-Domäne, nicht aber

durch EIII7, EIII8, etc. hervorgerufen werden. Ein solcher Effekt ist bspw. in Chen et al., 1998 (aaO) beschrieben, d.h. eine schnelle Tyrosin-Phosphorylierung mehrerer intrazellulärer Proteine, im Gegensatz zu der eher langsamen Phosphorylierung nach einer durch die Domänen EIII8-9-10 vermittelten Adhäsion. Unter „niedermolekularen Verbindungen“ werden alle Verbindungen verstanden, deren relative Molekülmasse unter etwa 1000 - 1200 liegt. Unter „Aptameren“ werden auf Nukleinsäuren aufgebaute Moleküle verstanden, die in der Lage sind, als hochspezifische Liganden für eine große Anzahl von Biomolekülen zu fungieren. Unter einer „pro-angiogenen Therapie“ wird jede Therapieform verstanden, bei der die Angiogenese gefördert werden soll. Unter einer „anti-angiogenen Behandlung/Therapie“ wird jede Behandlungs-/Therapieform verstanden, die auf eine Inhibierung der Angiogenese abzielt. Unter „Gentherapie“ wird jede Form der Therapie verstanden, die auf die Ausschaltung einer genbedingten Fehlfunktion bzw. auf die Wiederherstellung einer normalen Genfunktion bei Erkrankungen abzielt, die durch die Eliminierung oder Bereitstellung eines Proteins zu beeinflussen sind. Sie kann das Einschleusen von Fremd-DNA in Körperzellen beinhalten, ist jedoch nicht als hierauf beschränkt anzusehen. Unter „Zellkulturen“ sollen sowohl Zellkulturmedien als auch Zellkulturgefäße verstanden werden. Bevorzugt sind die Zellkulturgefäße ausgewählt aus der Gruppe, die Zellkulturflaschen, -schalen, -napfe, -platten, Mikrotiterplatten, 96-Napf-Platten, Zellkulturkolben und Bioreaktoren umfaßt.

„Diagnostische Zwecke“ sind alle Zwecke, die dem Erkennen eines Zustandes eines Organismus/Organs/einer Zelle bzw. dem Zuordnen eines aktuellen Zustandes eines Organismus/Organs/einer Zelle zu einer bestimmten Zustandskategorie (z. B. einer bestimmten Krankheit) dienen, beispielsweise kann dies der Einsatz eines Kits/chemischer Reagenzien/einer Meßeinrichtung sein, zum Bestimmen einer physikalischen Größe, wie Temperatur etc., oder einer chemischen Größe, wie Konzentration etc., soll jedoch nicht als hierauf beschränkt angesehen werden.

„Therapeutische Zwecke“ sind alle Zwecke, die der Verbesserung bzw. der Heilung eines Krankheitszustandes eines Organismus/Organs/einer Zelle dienen. Unter dem Begriff „Verwendung eines Proteins zusammen mit einem Implantat“ ist entweder eine zeitlich oder eine räumlich identische Verwendung gemeint. Bei-

spielsweise können Proteinmoleküle an das Implantat bei dessen „Einbau“ in den Körper befestigt sein, oder aber sie können räumlich vom Implantat getrennt, aber zur gleichen Zeit wie dem „Einbau“ des Implantats verabreicht werden (Injektionen etc.).

- 5 Die Erfindung wird nunmehr detailliert anhand der folgenden Beispiele und Figuren beschrieben. Dabei zeigt:

Fig. 1 eine schematische Darstellung der in dieser Studie verwendeten Wiederholungssequenzen vom Typ III;

Fig. 2 die Resultate eines Proliferationsassay unter dem Einfluß der ED_b-Fibronectin-Domäne (ED-B) auf Endothelzellen bzw. menschliche Stromazellen auf verschiedenen Substraten;

Fig. 3 die Resultate eines Sprießtests (tube formation test) von Endothelzellen unter dem Einfluß von ED-B;

15 Fig. 4 die Resultate eines Anheftungstest, bei dem das Anheften von Endothelzellen an mit ED-B beschichteten Oberflächen getestet wurde;

Fig. 5 die Resultate eines Test, ähnlich zu dem in Fig. 4, mit der Ausnahme, daß die Zelle mit verschiedenen synthetischen Peptiden vorinkubiert wurden, deren Sequenzen Teilsequenzen der ED_b-Fibronectin-Domäne sind;

20 Fig. 6 die in Fig. 5 verwendeten Teilsequenzen der synthetischen Peptide aus der ED_b-Fibronectin-Domäne;

Fig. 7 die Resultate eines Anheftungstests von Endothelzellen an verschiedene synthetische ED-B-Peptide;

25 Fig. 8 die Lage der in Fig. 6 - 7 ermittelten synthetischen Peptide in einer Modellstruktur der Peptid-Hauptkette von ED-B;

Fig. 9 die Wirkung von der ED_b-Fibronektin-Domäne und eines aus Loop 5 stammenden Peptids (SEQ ID NO:2) auf die Induktion von Kapillar-ähnlichen Strukturen in einem Sprießtest (tube formation test);

Fig. 10 die Resultate zweier Affinitäts-Chromatographie-Läufe unter Verwendung von Fn-7-8-9 bzw. Fn-7-B-8-9 von Zell-Lysaten von Oberflächen-markierten menschlichen Hautendothelzellen;

Fig. 11 die Resultate zweier Affinitäts-Chromatographie-Läufe unter Verwendung von Fn-7-8-9 bzw. Fn-7-B-8-9 von Zell-Lysaten von Oberflächen-markierten menschlichen Haut-Stroma-Zellen.

Fig. 12 Affinitätschromatographische Reinigung des ED_bB-Rezeptors.

Fig. 13 Immunhistologisch charakterisierte humane Tumor-Cryoschnitte.

Fig. 1 zeigt verschiedene, in dieser Studie verwendete rekombinante Fibronektin-Fragmente, die unterschiedliche Domänen-Struktur mit unterschiedlichen Wiederholungssequenzen vom Typ III aufweisen. Dabei umfassen Fn-7-B-8-9 die Fibronektin-Domänen 7, ED_b, 8 und 9, Fn-7-8-9 die Domänen 7, 8 und 9, ED-B die Domäne ED_b, Fn-10 die Domäne 10 und Fn-6 die Domäne 6. Diese Proteine wurden als mit einem His-Tag versehene Proteine in E. coli exprimiert und auf einer Nickel-Chelat-Sepharosesäule aufgereinigt. Die in dieser Studie verwendeten Nummernbezeichnungen entsprechen den in der Literatur verwendeten. Dabei bezeichnen die Abkürzungen FN-B, ED-B, EDB und ED_b alle jeweils die ED_b-Fibronektin-Domäne und sind als synonym anzusehen.

Fig. 2 zeigt die Resultate eines Proliferationsassay, bei dem die Wirkung der ED_b-Fibronektin-Domäne (ED-B) auf die Proliferation von Endothelzellen (EC) bzw. Stroma-Zellen (SC) untersucht wurde. 1000 Zellen pro Napf wurden in 96-Napf-Platten inkubiert. Lösliches ED-B (10 µg/l) wurde dem Medium während des Proliferationsassays zugegeben. Nach drei Tagen wurde die Zellzahl mit dem MTS-Assay bestimmt. Die Proliferation der Zellen wurde durch basischen Fibronektin-Wachstumsfaktor (bFGF) induziert. Es zeigte sich, daß ED-B keine Wirkung in Abwesenheit von bFGF hatte, und ebenso konnte keine Wirkung für die Fibronektin-

tin-Domäne 10 vom Typ III in Anwesenheit von bFGF auf die Zellen nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Eine Wirkung von ED-B auf menschliche Endothelzellen-Proliferation konnte bei Zellen festgestellt werden, die auf Gelatine ausplattiert worden waren (EC/Gelatine), ebenso bei Zellen, die auf Collagen ausplattiert worden waren (EC/Collagen), wobei jedoch letzterer Effekt nicht so deutlich war, wie beim Ausplattieren auf Gelatine. Bei menschlichen Stroma-Zellen auf Gelatine (SC/Gelatine) fand eine Proliferation bereits in Abwesenheit von bFGF statt, die deutlich über der von menschlichen Endothelzellen lag. Sie konnte durch die Zugabe von bFGF bzw. bFGF + ED-B nicht gesteigert werden. Als Maß für die Zellzahl wurde die Extinktion bei 490 nm bestimmt.

Für den Proliferationsassay wurde folgende experimentelle Methode befolgt:

Material: 96-Napf-Platte (mit flachem Boden), Nunc

Medium: MCDB 131, Pen/Strep, Amphotericin (0,25 µg/ml), Heparin (20 µg/ml), hitze-inaktiviertes FCS (5 %)

15 Methode:

Zellen, 500-1000 pro Napf (96-Napf-Platte) in 100 µl, werden für 3 Tage in Medium mit bFGF (1 - 3 ng/ml) oder VEGF (30 - 50 ng/ml) kultiviert. Die genaue Menge sollte für jede Charge durch Titration bestimmt werden: optimal ist die minimale Konzentration, die maximale Proliferationsstimulation erreicht. Eine Synchronisation der Zellen vor dem Experiment ist nicht notwendig, kann aber gemacht werden. Nach 3 Tagen wird die Zellzahl mit dem MTS-Kit (Promega) nach Herstellerangaben bestimmt. Es empfiehlt sich, die Absorption bei mehreren Zeitpunkten zu messen, um eine maximale Absorption im linearen Bereich zu erhalten (0,5; 1; 2; 4 Stunden).

25 Kontrollen:

Negative Kontrolle, kein Mitogen (keine Proliferation) (-bFGF/VEGF)

Positive Kontrolle, mit Mitogen (maximale Stimulation) (+bFGF/VEGF)

Fig. 3 zeigt die Wirkung von ED-B auf das Sprießen von Endothelzellen aus Sphäroiden. Hierzu wurden HUVEC-Sphäroide (Human Umbilical Vein Endothelial Cells = menschliche Nabelschnur-Endothelzellen) in Collagen eingebettet und durch die Zugabe von 10 µg/ml bFGF (basic Fibroblast Growth Factor) zum Sprießen induziert in Ab- oder Anwesenheit von 6 µg/ml ED-B. Es zeigte sich, daß durch die Zugabe von bFGF alleine das Sprießen induziert und dann durch die Zugabe von ED-B weiter stimuliert werden konnte (+ bFGF + ED-B).

Für den Sprießtest (tube formation test) wurde folgende experimentelle Methode verwendet:

10 Material:

- Methylcellulose, höchste Viskosität (Sigma)
- Trypsin/EDTA für Zellkultur (Gibco)
- Rundboden 96-Napf-Platten (Greiner #650185)
- rekombinantes bFGF (Gibco #13256-029)
- 15 rekombinantes VEGF (R & D System)
- Anti-Ratte-CD31 (RDI #RDI-CD31TLD)
- Heparin (Gibco #15077-027)

Lösungen:

- 20 PBS/Antibiotika: Zellkultur-PBS, 10 x Pen/Strep, 2,5 µg/ml Amphotericin
- 1 % Gelatine (Difco, autoklavieren und nach Abkühlung mit Pen/Strep und Amphotericin (0,25 µg/ml) versetzen

Medium: MCDB 131, Glutamin, Pen/Strep, Amphotericin (0,25 µg/ml), Heparin (20 µg/ml), hitzeinaktiviertes FCS (10 %)

- 25 Wachstumsmedium: Medium mit 2 ng/ml bFGF und 10 ng/ml VEGF

Zellen:

HUVEC

Dermale MVEC (Passage >4)

Methode:

Endothelzellen werden mit Trypsin/EDTA abgelöst und auf 5000 Zellen/ml in Medium mit 0,24 % Methylcellulose verdünnt. Je 200 μ l (1000 Zellen) werden in Nöpfen einer Greiner-Platte gegeben und über Nacht inkubiert. Runde Zellhaufen (Sphäroide) werden mit einer 1 ml-Pipette mit abgeschnittener Spitze geerntet und abzentrifugiert. Sphäroide werden in 1,2 % Methylcellulose/FCS resuspendiert und mit neutralisiertem Collagengel gemischt. ED_b und bFGF wurden co-polymerisiert.

Wie aus der Figur deutlich wird, erfolgt durch die Zugabe von ED-B eine deutliche Steigerung des Sprießens über das durch bFGF induzierte Maß hinaus.

Fig. 4 zeigt die Resultate eines Adhäsionstest von Endothelzellen an Mikrotiter-napf-Platten, die mit ED-B beschichtet waren. Hierzu wurden Endothelzellen aus ihrem ursprünglichen Kulturgefäß durch Trypsinisierung (Trypsin/EDTA) von ihrem Substrat gelöst und dann in Mikrotiternapf-Platten, die mit verschiedenen Konzentrationen (0, 1, 2, 3, 5, 10, 20, 40 μ g/ml) ED-B beschichtet waren, inkubiert und für eine Stunde zum Anhaften belassen. Als eine Negativ-Kontrolle dienten Näpfe, die mit 1 mg/ml BSA (bovinem Serumalbumin) beschichtet waren; die Adhäsion an BSA (< 10 %) wurde substrahiert.

Das Anheften wurde durch Färbung mit Kristallviolett quantifiziert, gefolgt von einer Lyse mit SDS. Die Quantifizierung erfolgte durch Messen der Extinktion bei 595 nm. Eine in der Figur waagrecht angebrachte Linie bei $A_{595 \text{ nm}} \approx 1,06$ zeigt die 100 %ige Adhäsion an Plasma-Fibronektin an.

Das Ergebnis dieses Versuchs zeigt an, daß die Zellen an den mit ED-B beschichteten Oberflächen anhaften, was einen Rezeptor auf der Zelloberfläche für ED-B nahelegt.

Für den Anheftungs/Adhäsionstest wurde folgende experimentelle Methode verwendet:

Lösungen:

1 % BSA (Sigma, Ethanol-präzipitiert)

2 % Serum in PBS (oder eine Trypsin-Neutralisationslösung)

5 Medium: MCDB 131, Pen/Strep, Amphotericin (0,25 µg/ml), Heparin (20 µg/ml), 0,1 % BSA (Sigma, Äthanol-präzipitiert)

0,1 % Kristallviolett, 2 % Glutaraldehyd in PBS, sterilfiltriert

2 % SDS

Methode:

10 Näpfe einer 96-Napf-Platte (Nunc) werden für eine Stunde bei 37°C mit Protein belegt. Bei kleinen Proteinen (<20 kDa) oder Peptiden empfiehlt es sich, diese auf der Platte trocknen zu lassen (über Nacht ohne Deckel unter der Sterilbank). Danach werden die Näpfe mit 1 % BSA für 1 h bei 37°C abgesättigt. Zellen werden mit 1 X Trypsin abgelöst, mit 2 % Serum zur Inaktivierung des Trypsins gewaschen, und in Medium resuspendiert. Wenn Antikörper oder Peptide getestet werden sollen, werden die Zellen in Suspension mit diesen für 30 min bei 37°C vorinkubiert. Pro Napf (96-Napf-Platte) werden 10^4 Zellen in einem Volumen von 50 - 100 µl für 1 h bei 37°C inkubiert. Der Überstand wird vorsichtig abgegossen, die Platte zum Abtropfen auf einem Papierhandtuch für 1 min umgedreht stehen lassen und angeheftete Zellen werden mit Kristallviolett/Glutaraldehyd für 15 min 20 gefärbt und fixiert. Die Näpfe werden 3mal mit PBS gewaschen und die Zellen anschließend durch Zugabe von 2 % SDS lysiert (15 min auf dem Schüttler). Die Absorption bei 595 nm wird gemessen. Nach dreimaligem Waschen mit Wasser können die Zellen, falls erwünscht, erneut angefärbt werden.

Kontrollen:

25 Negative Kontrolle: Leer-Näpfe (BSA-Kontrolle)
Positive Kontrolle: Plasma-Fibronektin (2,5 µg/ml)

$$\% \text{ Adhäsion} = A_{595} (\text{Probe}) : 100 \times A_{595} (\text{Fibronektin})$$

Fig. 5 zeigt die Resultate eines Test, ähnlich dem aus Fig. 4 mit der Ausnahme, daß vor dem Anheften an mit ED-B beschichteten Mikrotiternapf-Platten die Endothelzellen mit 250 µM verschiedener synthetischer Peptide vorinkubiert wurden, deren Sequenz eine Teilsequenz der ED_b-Fibronektin-Domäne war. Die Anheftung wurde durch die Bestimmung der Extinktion bei 595 nm (A_{595}) bestimmt. Die in der Figur aufgetragenen Peptidbezeichnungen werden in Fig. 6 erläutert. Dabei entspricht Peptidsequenz Nr. 043 der in SEQ ID NO:1 dargestellten Sequenz, Peptidsequenz Nr. 553 der SEQ ID NO:2, Peptidsequenz Nr. 038 der SEQ ID NO:3. Ein hoher A_{595} -Wert entspricht einer nicht-inhibierten Anhaftung, während ein niedriger A_{595} -Wert einer Inhibition der Anhaftung durch das entsprechende Peptid entspricht.

Die für Fig. 4 beschriebene Methode wurde befolgt.

Fig. 6 zeigt die der Gesamtsequenz der ED_b-Fibronektin-Domäne entnommenen Teilsequenzen der synthetischen ED-B-Peptide mit den dazu gewählten Sequenzbezeichnungen. Es wird der Ein-Buchstaben-Code für Aminosäuren verwendet.

Fig. 7 zeigt die Resultate eines Tests, ähnlich zu dem in Fig. 5, außer, daß hier die Mikrotiternapf-Platten nicht mit der ED_b-Fibronektin-Domäne beschichtet waren, sondern mit den sich im Test aus Fig. 5 als inhibitorisch erwiesenen Peptiden, bzw. nicht-inhibitorisch erwiesenen Peptide vor-inkubiert wurden und somit mit diesen beschichtet wurden. Dabei zeigt es sich, daß die Zellen in diesen Tests nunmehr bei einer Beschichtung mit jeweils eines der inhibitorischen Peptide Anheftung zeigen, gemessen am A_{595} -Wert, während ein aus Fig. 5 als nicht-inhibitorisches erwiesenes Peptid zu keiner Anheftung führt.

Die für Fig. 4 beschriebene Methode wurde befolgt.

Fig. 8 zeigt eine Modellstruktur der ED_b-Fibronektin-Domäne (ED-B), aus dem die Lage der inhibitorischen Peptide Nr. 1 (= SEQ ID NO:1), Nr. 2 (= SEQ ID NO:2) und Nr. 3 (= SEQ ID NO:3) hervorgeht. Es zeigt sich, daß sich diese inhibitori-

schen Peptide auf Loop 1 bzw. Loop 5 der ED-B-Struktur befinden und damit die Region der Domäne identifizieren, über die eine Bindung zur Zelle bzw. dem auf der Zelle befindlichen Rezeptor stattfindet. Die in Fig. 8 gezeigte Modellstruktur der ED-B-Domäne beruht auf einer bereits ermittelten Struktur der Fibronectin-Domäne 7 vom Typ III. N-T und C-T stehen für N- bzw. C-Terminus.

Fig. 9 zeigt die Resultate eines Tests, bei dem die Wirkung der Zugabe von ED-B und dem zuvor als inhibitorisch ermittelten Peptid Nr. 2 sowie die Zugabe der Fibronectin-Domäne 6 vom Typ III auf die Induktion von Kapillar-ähnlichen Strukturen (tube formation) im Sprießtest untersucht wird. Es zeigt sich, daß über dem basalen, durch bFGF induzierten Eindringen in Collagen-Gele die größte Wirkung durch das Anheftungs-inhibitorische Peptid SEQ ID NO:2 erzeugt wird. Dieses Peptid hat also eine stimulatorische Wirkung auf das Eindringen von Endothelzellen in Collagen-Gele. Dieses Peptid entspricht daher der Bindungsregion von ED_b und stimuliert, in Analogie zu ED_b selbst, das Eindringen von Endothelzellen in das Collagen.

Die für Fig. 3 beschriebene Methode wurde befolgt.

Fig. 10 zeigt die Resultate einer Affinitätschromatographie von Zell-Lysat aus Oberflächen-markierten, menschlichen Hautendothelzellen. Hierzu wurden proliferierende, an der Zelloberfläche biotinylierte Endothelzellen mit einem Detergenz lysiert und einer Affinitätschromatographie unterzogen, bei der kurze Fragmente Fibronectin mit oder ohne die eingefügte ED_b-Fibronectin-Domäne an Sepharose gekoppelt waren (mit der ED_b-Fibronectin-Domäne = Fn-7-B-8-9, ohne die ED_b-Fibronectin-Domäne = Fn-7-8-9). Es konnte gezeigt werden, daß ein biotinyliertes Protein mit einem apparenten Molekulargewicht von 120 - 130 kDa spezifisch an das ED-B-enthaltende Fragment bindet (siehe Pfeil). Die Elution erfolgt mittels EDTA. Es wurden mehrere, im folgenden beschriebene Fraktionen gesammelt. Die Fraktionen wurden anschließend SDS-PAGE unterzogen und mit Western-Blot mit Streptavidin-Peroxidase- und Chemolumineszenz (ECL) untersucht. Die Spuren 1 und 5 zeigen Prä-Elutions-Fraktionen, während die Spuren 2, 3, 4 bzw. 6, 7, 8 die eluierten Fraktionen 1, 2 und 3 zeigen. Spuren 1 - 4 zeigen die Chromatographie mit Fn-7-8-9, während Spuren 5 - 8 die Chromatographie mit Fn-7-B-8-9 zeigen. Das hier gezeigte Resultat ist ein starkes Indiz dafür, daß die promi-

nente Bande mit einem Molekulargewicht zwischen 120 - 130 kDa ein Protein ist, das spezifisch an ein ED_b-enthaltende Fibronectin-Fragment bindet und somit einen Rezeptor für die ED_b-Fibronectin-Domäne darstellt.

Für die Biotinylierung und Lyse der Endothelzellen wurde folgende experimentelle

5 Methode befolgt:

Material: Biotinamidohexansäure-3-sulfo-N-Hydroxysuccinimid-Ester; Sigma
PBS w/o Mg/Ca (Dulbecco)

Hepes-Puffer: 20 mM Hepes pH 7,6, 1 mM CaCl₂, 1 µM MgCl₂, 0,1
% NaN₃,

10 1 % CHAPS (V/V)

und Boehringer vollständiger Mini Protease-Inhibitor, EDTA-frei,
Cocktail-Tabletten

Methode: Die Zellkulturflaschen werden vor und nach dem Biotinylieren jeweils
3mal mit PBS w/Ca + Mg gewaschen. Vor dem letzten Waschvorgang wird der
15 Biotinpuffer (1mg/15ml PBS) angesetzt. In jede der Flaschen werden langsam 5
ml des Puffers (für 225 cm²) oder 12,5 ml (500 cm² Platten) in die Mitte des Bo-
dens pipettiert, so daß sich das Volumen über den ganzen Flaschenboden unter
Schwenken verteilen kann. Dann wird die erste Kulturflasche mit der Hälfte des
Lysepuffervolumens behandelt. Der Puffer wird ebenfalls in die Mitte des Fla-
schenbodens pipettiert und über die gesamte Oberfläche verteilt. Dann werden die
Zellen mit Hilfe eines Zellschabers abgeschabt. Anschließend wird das Gesamt-
volumen der 1. Kulturflasche in die 2. Flasche pipettiert, wo der Vorgang dann
wiederholt wird. Nach der letzten Flasche wird das Volumen in ein 50 ml koni-
sches Zentrifugenröhrchen überführt. Mit der anderen Hälfte des Lysepuffers wird
25 dieser Vorgang in allen Kulturflaschen wiederholt (ohne Zellschaber) und das
Endvolumen ebenfalls in Zentrifugenröhrchen gegeben. Zentrifugiert wird in 50 ml
konischen Zellkulturröhrchen bei 3000 U/min, 5 min bei RT (Heraeus-
Tischzentrifuge). Das Lysat wird abpipettiert und sollte idealerweise sofort für die
Affinitätschromatographie eingesetzt werden (kann notfalls aber auch bei -80°C
30 eingefroren werden).

Für die kovalente Kopplung von Proteinen an Sepharose wurde folgendes Vorgehen gewählt:

Material: aktivierte CH Sepharose 4 B Pharmacia Biotech,
Code-No. 17-0490-01

5 1 mmol HCl, 2,2 % NaHCO₃

Methode: Die HCl wird im Eisbad gekühlt, die Sepharose läßt man auf Raumtemperatur erwärmen.

Dann wird die Sepharose mit 1 mmol HCl gewaschen. Pro ml Sepharose benötigt man 10 ml HCl. Die Sepharose läßt man langsam in das vorgekühlte Röhrchen rieseln, wo sie dann für etwa 15 Minuten aufquillt. (1 g Sepharose entspricht 3 ml gequollener Sepharose). Anschließend wird das Röhrchen für 1 Min. bei 800 U zentrifugiert. Der Überstand wird abpipettiert und verworfen.

Dieser Vorgang wird 3mal wiederholt.

15 Nach dem 3. Waschen wird erneut HCl zugegeben, das Röhrchen wird geschwenkt und 3 - 5 Min. bei 800 U zentrifugiert. Der Überstand wird abpipettiert und das Pellet wird mit 20 ml Millipore-Wasser gelöst und in 2 neue Zentrifugenröhrchen überführt (je 1 Röhrchen für 7-EDB-8-9 Sepharose und für 7-8-9 Sepharose, d.h. Sepharose, an die ein Polypeptid mit den Repeats III7, ED_b, III8 und III9 bzw. III7, III8 und III9 gekoppelt ist.). Die Röhrchen werden sofort wieder abzentrifugiert, der Überstand wird abpipettiert und die 1 -5 mg Protein/ml Sepharose
20 können gekoppelt werden.

(d. h. 2 mg Protein/ml Sepharose 7-8-9

2 mg „ „ 7-EDB-8-9)

25 Die Röhrchen werden durch Umschwenken gemischt. Dann erfolgt zügig die Zugabe von 2,2 % NaHCO₃. (50 µl/ml Gel). Dadurch wird die restliche HCl neutralisiert. Die Röhrchen werden umgeschwenkt und bei höchster Stufe auf einem „Wipptisch“ für 1 – 5 Std. durchgemischt.

Anschließend werden die Röhrchen wieder abzentrifugiert.

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration, die bei der kovalenten Kopplung an Sepharose eingesetzt werden soll, wurde ein Bradford-Test durchgeführt:

Material: BSA-Stammlösung 2 mg/ml

5 Bradford Reagenz

Methode: Die BSA-Lösung wird wie folgt auf eine Nunc-Immuno-Plate (Maxi Sorp) aufgetragen: 5µg-4µg-3µg-2µg-1µg (80 µl Vol. + 20 µl Assay)

Vorverdünnung für BSA: 5µg/50µl = 0,1 mg/ml

Die Stammlsg. 2 mg/ml wird durch eine 1:20-Verdünnung auf eine Konzentration von 0,1 mg/ml verdünnt.

Zur Durchführung der Affinitätschromatographie bzw. zur Elution wurde folgendes Vorgehen gewählt:

a) Affinitätschromatographie

Material: aktivierte CH Sepharose 4B Pharmacia Biotech,

15 Code-No. 17-0490-01

Puffer A (20 mM Hepes pH 7,6, 1 mM CaCl₂, 1mM MgCl₂, 0,1 % NaN₃)

Puffer B (Puffer A + 150 mM NaCl + 0,1 % Chaps)

Puffer C (Puffer A + 0,1 % Chaps)

PH 4-Puffer (Millipore-Wasser + 0,1 % Eisessig + 0,1 % Chaps)

20 EDTA-Puffer (Puffer A + 200 mM EDTA pH 8,5 + 0,1 % Chaps)

Methode: Das Lysat wird zunächst 3 x über die Säule geschickt.

Unter der Säule befindet sich ein Röhrchen zum Auffangen der Flüssigkeit. Die ersten 2 ml des Lysats werden vorsichtig mit einer Eppendorfpipette auf das Gel gegeben. Für das weitere Lysatvolumen verwendet man eine Meßpipette. Zu be-
 25 achten ist, daß die Säule gerade ist. Wird die Säule zum ersten Mal benutzt, wird vor dem eigentlichen Durchlauf ein „Trockendurchlauf“ mit allen proteinfreien Puffern durchgeführt. Eine Säulenfüllung sollte maximal 5 x benutzt werden.

Wenn das Lysat eingefroren (-80°C) vorliegt, wird es zunächst im Wasserbad erwärmt und dann zentrifugiert (5 min. bei 3000 U).

Frisches Lysat ist jedoch immer dem eingefrorenen vorzuziehen.

Von dem Lysat werden 500 μl in ein Eppendorfgefäß abpipettiert.

- 5 Dies dient zur Untersuchung des Lysats vor und nach der Chromatographie..

Werden 2 Säulen verwendet (je eine für 7-8-9 Sepharose und für 7-B-8-9 Sepharose), wird jeweils die Hälfte des Lysatvolumens über jede der Säulen geschickt. Beide Säulen sollten dieselbe Flußrate haben. Ist dies nicht der Fall, wird die „langsamere“ Säule entsprechend lange geschlossen. Die ideale Flußrate beträgt 0,2 - 0,5 ml/min.

Ist das Lysat 3 x durch die Säule gelaufen, wird von dem Durchlauf, nachdem er gemischt wurde, ebenfalls 500 μl in ein Eppendorfgefäß pipettiert, damit auch hier eine Untersuchung erfolgen kann.

- 15 Anschließend werden je 10 Säulenvolumina Puffer B und Puffer C über die Säule geschickt. Danach ist der Waschvorgang abgeschlossen.

b) Elution

Präelution: Puffer C wird über die Säule geschickt, damit festgestellt werden kann, ob trotz der Waschprozedur noch Proteine verblieben sind. 500 μl werden in einem Eppendorf-Gefäß aufgefangen. (Bei 2 Säulen entsprechend 2 x 500 μl).

- 20 EDTA-Elution: EDTA komplexiert die Ca- und Mg-Ionen. Dadurch werden die Endothelzell-Proteine eluiert, die Ca und Mg zur Bindung benötigen. 2 x 4 ml EDTA-Puffer werden über die Säule (bzw. über beide Säulen) geschickt und in 2 Fraktionen (E1 u. E2 / BE1 u. BE 2) in Falcon-Röhrchen aufgefangen. Dann wird der Röhrcheninhalt gemischt und 5000 μl werden in ein (bzw. 2) Eppendorfgefäß(e)
25 abpipettiert.

pH 4-Elution: Der eigentliche pH-Wert des Puffers beträgt 3,7. Außerhalb des neutralen pH-Bereiches (pH 6 - 8) kann man die Bindung des Rezeptors an sein

Protein hemmen. Auch hier werden wie bei der EDTA-Elution 2 x 4 ml PH 4-Puffer über die Säule geschickt, in 2 Fraktionen gesammelt und jeweils 500 µl abpipetiert (4,1 u. 4,1 / B 4,1 und B 4,2).

5 Anschließend werden 3 Säulenvolumen Puffer A über die Säule gegeben, damit die Säure herausgewaschen wird. Das letzte Säulenvolumen verbleibt in der Säule. Die Säule wird geschlossen und im Kühlschrank verwahrt.

Die 500 µl-Fraktionen in den Eppendorfgläsern werden für mind. 15 Min. bei -80°C eingefroren und anschließend in einem „Speed vac“ gefriergetrocknet.

Die so erhaltenen Fraktionen bzw. Prä-Elutions-Fraktionen wurden mit SDS-PAGE aufgetrennt und einem Western Blot unter reduzierenden Bedingungen unterzogen.

15 **Fig. 11** zeigt dasselbe Experiment wie in Fig. 10, mit der Ausnahme, daß hier nicht lysierte Endothelzellen, sondern lysierte Stroma-Zellen verwendet werden. In dem in Fig. 11 gezeigten Western-Blot zeigen die Spuren 1 - 3 die Elution von einer Affinitätssäule mit Fn-7-8-9, während die Spuren 4 - 6 die Elution von einer Affinitätssäule von Fn-7-B-8-9 zeigen. Spuren 1 und 4 sind Prä-Elutionsfaktoren, während Spuren 2, 3 bzw. 5, 6 die Fraktionen 1 und 2 des jeweiligen Elutionslaufes zeigen. Eine prominente Bande mit einem apparenten Molekulargewicht von 120 - 130 kDa, wie sie in Fig. 10 zu sehen ist, kann bei diesem Zell-Lysat aus menschlichen Stroma-Zellen nicht festgestellt werden.

Die in der vorstehenden Beschreibung, den Ansprüchen sowie den Zeichnungen offenbarten Merkmale der Erfindung können sowohl einzeln als auch in beliebigen Kombinationen für die Verwirklichung der Erfindung in ihren verschiedenen Ausführungsformen wesentlich sein.

25 **Fig. 12** zeigt das ED-B-Bindungsprotein, welches mittels Affinitätschromatografie, wie beschrieben, aufgereinigt und mittels SDS-Gradientengelelektrophorese (4-12%) aufgetrennt wurde. Die spezifisch angereicherten Doppel-Banden (Pfeile) wurden ausgeschnitten und mittels Massenspektroskopie analysiert.

Die Sequenzanalyse identifizierte das isolierte Protein eindeutig als das alpha2-beta1-Integrin, wobei die prädominante, schwere Bande der beta1-, die leichte Bande der alpha2-Untereinheit entspricht.

- 5 Dieser Befund spricht dafür, daß die Bindung an EDB hauptsächlich durch die beta1-Untereinheit des Integrins vermittelt wird. Entsprechend des untersuchten Zelltyps können auch andere alpa-Untereinheiten (e.g. alpha2) mit beta1 kombiniert die Bindung an EDB-FN vermitteln.

- 10 **Fig. 13** zeigt immunhistologisch charakterisierte humanene Tumor-Cryoschnitten, wobei bedeuten:
- A: Nierenzellkarzinom, Pfeile zeigen die spezifische Färbung mittels AK AM-EDBr-2
- B: Close-up des selben Präparates
- C: Hepatozelluläres Karzinom
- 15 D: Melanom (hier wurde keine spezifische Färbung gefunden)

Analyse des EDB-Rezeptors

Die Banden wurden aus einem 1D-Gel ausgeschnitten, mit NH_4HCO_3 -Lösung und Acetonitril gewaschen, getrocknet und mit Trypsinlösung zur Proteolyse der Proteine im Gel versetzt. Die aus dem Gel in die Verdauung eluierten Peptide wurden über μC_{18} -Säulen aufkonzentriert und entsalzt und mit MALDI-Massenspektrometrie vermessen (= Liste von Peptidmassen des verdauten Proteins).

Mit den gefundenen Peptidmassen aus jeder Gelbande wurde eine Datenbanksuche durchgeführt. Bei nicht eindeutigen Suchergebnissen wurden zusätzlich MALDI-PSD-Spektren (Fragmentspektren) eines einzelnen Peptids vermessen.

Die Spektren wurden entweder direkt zur Bestätigung einer vermuteten Peptidsequenz verwendet (Interpretation des Spektrums) oder es wurde eine Datenbanksuche mit diesen Spektren durchgeführt.

Untersuchte Banden:

Bande A = Bande 1 aus Präparation 6
 Bande 4 aus Präparation 5
 Bande 6 aus der sauren Elution

Ergebnis: Integrin $\alpha 2$

- siehe Datenbanksuchergebnis Bande 4
- die Spektren aus Bande 1 und 6 zeigen die gleichen intensivsten Peptide ein PSD-Spektrum eines Peptids aus Bande 1 bestätigt eine Teilsequenz von Integrin $\alpha 2$

Bande B = Bande 2 aus Präparation 6
 Bande 5 aus Präparation 5
 Bande 7 aus der sauren Elution

Ergebnis: Integrin β 1

- siehe Datenbanksuchergebnisse Bande 5 und 7
- 5 - das Spektrum aus Bande 2 zeigt die gleichen intensivsten Peptide
- die Datenbanksuche mit einem PSD-Spektrum aus Bande 2 bestätigte Integrin β 1

BSA

10

- ist in allen drei Banden enthalten
- durch die Datenbanksuche mit einem PSD-Spektrum und zahlreiche Peptidmassen bestätigt

15

```
function expandIt(whichE1) {whichE1.style.display = (whichE1.style.display == "none")? "":"none";}
```

ProFound - Search Result Summary

Version 4.10.6

© 1997-2000 ProteoMetrics

```
20 A: hover { COLOR: red } function toggleIt(E1) {whichIm = event.srcElement;if (E1.style.display ==
"none"){E1.style.display = "";whichIm.src = "/prowl/minus.gif";}else{whichIm.src =
"/prowl/plus.gif";E1.style.display = "none";}} A: hover { COLOR: red }
```

Protein Candidates for search 20010208092948-0121-149234049162 [121056 sequences searched]

| <u>Ran</u> | <u>Probabili</u> | <u>Est'd</u> | <u>Protein Information and Sequence Analyse Tools (T)</u> | <u>%</u> | <u>pI</u> | <u>kDa</u> |
|------------|------------------|--------------|--|----------|-----------|------------|
| <u>k</u> | <u>ty</u> | <u>Z</u> | | | | |
| 1 | 1.0e+000 | 2/20 | gi 4504743 ref NP_002194.1 integrin alpha 2 precursor | 19 | 5.2 | 129.28 |
| +2 | 2.3e-010 | - | gi 628012 pir A53933 myosin I myr 4 - rat | 15 | 9.6 | 116.17 |
| | - | - | gi 6981242 ref NP_037115.1 unconventional myosin from rat 4 for myosin I heavy chain | 15 | 9.6 | 116.12 |
| 3 | 8.3e-011 | - | gi 7513010 pir T00322 hypothetical protein KIAA0542 - human | 15 | 11.5 | 117.58 |
| 4 | 1.7e-012 | - | gi 4210973 gb AAD12058.1 (AF105016) vacuolar proton translocating ATPase 116-kDa subunit a2 isoform; V-ATPase 116-kDa isoform a2 isoform [Bos taurus] | 11 | 5.9 | 97.99 |

| | | | | | | |
|----|----------|---|--|-----------|-----|------------|
| 5 | 5.4e-013 | - | gi 543747 sp P36633 ABP_RAT AMILORIDE-SENSITIVE AMINE OXIDASE [COPPER-CONTAINING] PRECURSOR (DIAMINE OXIDASE) (DAO) (AMILORIDE-BINDING PROTEIN) (ABP) (HISTAMINASE) | <u>16</u> | 6.6 | 85.0 0 |
| 6 | 4.2e-013 | - | gi 7656867 ref NP_055059.1 a disintegrin-like and metalloprotease (reprolysin type) with thrombospondin type 1 motif, 2 | <u>12</u> | 6.8 | 134. 71 |
| 7 | 8.6e-014 | - | gi 3688530 emb CAA09465.1 (AJ011035) phospholipase C beta 2 [Rattus norvegicus] | <u>11</u> | 5.8 | 134. 87 |
| +8 | 6.5e-014 | - | gi 4504085 ref NP_000399.1 glycerol-3-phosphate dehydrogenase 2 (mitochondrial) | <u>21</u> | 7.0 | 80.8 0 |
| - | - | - | gi 7446012 pir G02093 glycerol-3-phosphate dehydrogenase - human | <u>21</u> | 7.3 | 80.8 2 |
| 9 | 5.0e-014 | - | gi 7513725 pir T29098 microtubule-associated protein 4, muscle- specific - mouse (fragment) | <u>14</u> | 8.1 | 114. 87 |
| 10 | 4.7e-014 | - | gi 6005970 ref NP_009078.1 zinc finger protein 175 | <u>22</u> | 9.6 | 81.5 9 |

NOTE:

1. To search again using unmatched masses, click the symbol @.
2. Highly similar protein sequences were given the same rank (IE user: click "+" to expand/contract).

Input Summary

Date & Time Thu Feb 08 08:29:55 2001 UTC (Search Time: 6.30 sec.)

Sample ID EDB Fibronectin, Bande 4

Database NCBI nr [..\databases\nr]

Taxonomy Catego- Mammalia (mammals)

ry

Prote- 80 - 135 kDa

in Mass Range

Protein pI Range 0.0 -14.0

Search for Single protein only

Digest Chemistry Trypsin

Max Missed Cut 2

Modifications +C3H5ON@C(Partial); +O@M(Partial);

Charge State MH+

Peptide Masses

(Da,Average)

Tolerance(AVG) 1.00 ppm

935.536 1007.504 1179.635 1222.729 1277.731 1307.689 1473.816 1479.833

Peptide Masses 1510.835 1553.895 1567.768 1586.801 1638.888 1707.772 1819.830

(Da,Monoisotopic) 1851.993 1915.959 1931.980 1947.990 1973.966 1993.998 2044.968

2051.077 2068.095 2095.065 2150.093 2224.097 2283.137 2344.115

2501.214 2705.123 2775.304 2872.336 2902.333 2932.502 3052.424
3280.542

Tolerance(MON) 50.00 ppm

Number of Pepti- 37

des

ProteoMetrics' ProFound is based on ProFound at The Rockefeller University [search + transmission time: >=6.33 sec]

function expandIt(whichE1) {whichE1.style.display = (whichE1.style.display == "none")? "":"none";}

ProFound - Search Result Summary

Version 4.10.6

© 1997-2000 ProteoMetrics

A: hover { COLOR: red } function toggleIt(E1) {whichIm = event.srcElement;if (E1.style.display == "none"){E1.style.display = "";whichIm.src = "/prowl/minus.gif";}else{whichIm.src = "/prowl/plus.gif";E1.style.display = "none";}} A: hover { COLOR: red }

Protein Candidates for search 20010207110038-0035-149234049162 [121056 sequences searched]

| <u>Ran</u> <u>k</u> | <u>Probabili</u> <u>ty</u> | <u>Est'd</u> <u>Z</u> | <u>Protein Information and Sequence Analyse Tools (T)</u> | <u>%</u> | <u>pI</u> | <u>kDa</u> |
|------------------------|-------------------------------|--------------------------|---|-----------|-----------|------------|
| | | | <u>gi 124963 sp P05556 ITB1_HUMAN</u> FIBRONECTIN RECEPTOR | | | |
| +1 | 1.0e+000 | 1.15 | BETA SUBUNIT PRECURSOR (INTEGRIN BETA-1) (CD29) | <u>17</u> | 5.3 | 88.4 5 |
| | | | (INTEGRIN VLA-4 BETA SUBUNIT) | | | |
| | - | - | <u>gi 762977 emb CAA33272.1 </u> (X15202) Fn receptor beta prechain [Mus musculus] | <u>11</u> | 5.8 | 88.1 8 |
| | - | - | <u>gi 72070 pir IJMSFB</u> fibronectin receptor beta chain precursor - mouse | <u>11</u> | 5.8 | 88.3 1 |
| | - | - | <u>gi 8393636 ref NP_058718.1 </u> integrin, beta 1 | <u>11</u> | 5.8 | 88.4 8 |
| | - | - | <u>gi 124964 sp P09055 ITB1_MOUSE</u> FIBRONECTIN RECEPTOR | <u>11</u> | 5.7 | 88.2 1 |
| | - | - | BETA SUBUNIT PRECURSOR (INTEGRIN BETA-1) | | | |
| | - | - | <u>gi 10336839 gb AAG16767.1 AF192528_1</u> (AF192528) integrin beta-1 subunit [Sus scrofa] | <u>11</u> | 5.3 | 88.2 5 |
| | - | - | <u>gi 1708573 sp P53712 ITB1_BOVIN</u> FIBRONECTIN RECEPTOR | | | |
| | - | - | BETA SUBUNIT (INTEGRIN BETA-1) (CD29) (INTEGRIN VLA-4 BETA SUBUNIT) | <u>9</u> | 5.3 | 85.3 1 |
| | - | - | <u>gi 1708574 sp P53713 ITB1_FELCA</u> FIBRONECTIN RECEPTOR | | | |
| | - | - | BETA SUBUNIT PRECURSOR (INTEGRIN BETA-1) (CD29) | <u>9</u> | 5.2 | 88.0 8 |
| | | | (INTEGRIN VLA-4 BETA SUBUNIT) | | | |
| 2 | 1.9e-004 | - | <u>gi 5453910 ref NP_006216.1 </u> phospholipase C, delta 1 | <u>8</u> | 6.2 | 85.7 5 |
| +3 | 7.7e-005 | - | <u>gi 1589134 prf 2210313A</u> phosphatidylinositol 3- | <u>10</u> | 5.9 | 83.4 |

| | | | | | | |
|-----|----------|---|--|-----------|-----|-----------|
| | | | kinase:SUBUNIT=55kD regulatory [Rattus norvegicus] | | | 6 |
| | - | - | gi 6981358 ref NP_037137.1 phosphoinositide 3-kinase p85 (other splicing variants: p55 and p50) | <u>8</u> | 5.9 | 83.5 1 |
| 4 | 1.8e-005 | - | gi 1163174 gb AAA85505.1 (U32575) similar to yeast Sec6p, Swiss- Prot Accession Number P32844; similar to mammalian B94, Swiss-Prot Accession Number Q03169; Method: conceptual translation supplied by author [Rattus norvegicus] | <u>8</u> | 5.8 | 86.4 8 |
| 5 | 1.1e-005 | - | gi 2137061 pir PC4183 1-phosphatidylinositol phosphodiesterase (EC 3.1.4.10) delta 1 - Chinese hamster (fragment) | <u>10</u> | 5.9 | 84.6 2 |
| 6 | 6.1e-006 | - | gi 9910238 ref NP_064388.1 general control of amino acid synthesis, yeast homolog-like 2 | <u>10</u> | 9.6 | 93.3 7 |
| 7 | 2.4e-006 | - | gi 10047327 dbj BAB13451.1 (AB046845) KIAA1625 protein [Homo sapiens] | <u>6</u> | 9.0 | 97.2 0 |
| 8 | 1.1e-006 | - | gi 5032191 ref NP_005793.1 tumor protein p53-binding protein | <u>10</u> | 9.7 | 93.4 8 |
| +9 | 9.9e-007 | - | gi 9910260 ref NP_064581.1 HCNP protein | <u>9</u> | 8.7 | 98.8 6 |
| | - | - | gi 6330235 dbj BAA86491.1 (AB033003) KIAA1177 protein [Homo sapiens] | <u>6</u> | 5.6 | 87.8 0 |
| +10 | 9.6e-007 | - | gi 9453796 emb CAB99365.1 (AL117378) dJ131F15.2 (phospho- diesterase I/nucleotide pyrophosphatase 1 (homologous to mouse Ly- 41 antigen) (PC1, NPPS)) [Homo sapiens] | <u>11</u> | 6.8 | 96.8 3 |
| | - | - | gi 129678 sp P22413 PC1_HUMAN PLASMA-CELL MEMBRANE GLYCOPROTEIN PC-1 [INCLUDES: ALKALINE PHOSPHODIESTERASE I ; NUCLEOTIDE PYROPHOSPHATASE (NPPASE)] | <u>7</u> | 6.8 | 99.9 1 |

NOTE:

1. To search again using unmatched masses, click the symbol @.
2. Highly similar protein sequences were given the same rank (IE user: click "+" to expand/contract).

Input Summary

Date & Time Wed Feb 07 10:00:44 2001 UTC (Search Time: 5.91 sec.)

Sample ID EDB Fibronectin, #0824, Bande 5

Database NCBI nr [...\databases\nr]

Taxonomy Catego- Mammalia (mammals)

ry

Prote- 80 - 100 kDa

in Mass Range

Protein pI Range 0.0 -14.0

Search for Single protein only

Digest Chemistry Trypsin

Max Missed Cut 2**Modifications** +C3H5ON@C(Partial); +O@M(Partial);**Charge State** MH+**Peptide Masses****(Da,Average)****Tolerance(AVG)** 1.00 ppm

881.288 927.495 983.498 1007.525 1222.666 1376.820 1422.642 1439.854

Peptide Masses 1475.797 1479.791 1553.852 1567.742 1638.888 1781.886 1915.892**(Da,Monoisotopic)** 1961.078 2019.135 2044.949 2225.083 2283.131 2470.203 3143.411

3299.415 3323.912 3337.675

Tolerance(MON) 50.00 ppm**Number of Pepti-** 25**des**

ProteoMetrics' ProFound is based on ProFound at The Rockefeller University [search + transmission time: >=5.94 sec]

5

```
function expandIt(whichE1) {whichE1.style.display = (whichE1.style.display == "none")? "":"none";}
```

ProFound - Search Result Summary

Version 4.10.6

© 1997-2000 ProteoMetrics

```
A: hover { COLOR: red } function toggleIt(E1) {whichIm = event.srcElement;if (E1.style.display ==
10 "none"){E1.style.display = "";whichIm.src = "/prowl/minus.gif";}else{whichIm.src =
"/prowl/plus.gif";E1.style.display = "none";}} A: hover { COLOR: red }
```

Protein Candidates for search 20010207110746-00D6-149234049162 [121056 sequences searched]Rank

+

11.0e+000

Est'd
Z

1.61

Protein Information and Sequence Analyse Tools (T)%pIkDagi|124963|sp|P05556|ITB1_HUMAN FIBRONECTIN RECEPTOR

BETA SUBUNIT PRECURSOR (INTEGRIN BETA-1) (CD29)

(INTEGRIN VLA-4 BETA SUBUNIT)

18

5.3

88.4
5gi|10336839|gb|AAG16767.1|AF192528_1 (AF192528) integrin beta-1
subunit [Sus scrofa]12

5.3

88.2
5gi|762977|emb|CAA33272.1| (X15202) Fn receptor beta prechain [Mus
musculus]12

5.8

88.1
8gi|72070|pir|IJMSFB fibronectin receptor beta chain precursor - mouse12

5.8

88.3
1

| | | | | | |
|-----------|---|---|-----------|-----|-----------|
| - | - | <u>gi 124964 sp P09055 ITB1_MOUSE</u> FIBRONECTIN RECEPTOR BETA SUBUNIT PRECURSOR (INTEGRIN BETA-1) | <u>12</u> | 5.7 | 88.2 1 |
| - | - | <u>gi 8393636 ref NP_058718.1 </u> integrin, beta 1 | <u>12</u> | 5.8 | 88.4 8 |
| - | - | <u>gi 1708573 sp P53712 ITB1_BOVIN</u> FIBRONECTIN RECEPTOR BETA SUBUNIT (INTEGRIN BETA-1) (CD29) (INTEGRIN VLA-4 BETA SUBUNIT) | <u>10</u> | 5.3 | 85.3 1 |
| - | - | <u>gi 1708574 sp P53713 ITB1_FELCA</u> FIBRONECTIN RECEPTOR BETA SUBUNIT PRECURSOR (INTEGRIN BETA-1) (CD29) (INTEGRIN VLA-4 BETA SUBUNIT) | <u>11</u> | 5.2 | 88.0 8 |
| 23.1e-006 | - | <u>gi 479805 pir S35458</u> SNF2 protein homolog - human (fragment) | <u>12</u> | 7.0 | 88.5 9 |
| + | | | | | |
| 37.7e-007 | - | <u>gi 5725250 emb CAB52406.1 </u> (AJ245661) G7 protein [Homo sapiens] | <u>8</u> | 5.9 | 94.6 5 |
| - | - | <u>gi 3108220 gb AAC62533.1 </u> (AF048986) MutS homolog 5 [Homo sapiens] | <u>8</u> | 6.0 | 92.8 7 |
| - | - | <u>gi 4505253 ref NP_002432.1 </u> mutS (E. coli) homolog 5 | <u>8</u> | 6.0 | 92.8 6 |
| 46.7e-007 | - | <u>gi 7512247 pir I65253</u> disintegrin-like testicular metalloproteinase (EC 3.4.24.-) IVb - crab-eating macaque (fragment) | <u>14</u> | 6.6 | 80.8 2 |
| 51.8e-007 | - | <u>gi 10438454 dbj BAB15248.1 </u> (AK025824) unnamed protein product [Homo sapiens] | <u>19</u> | 6.4 | 80.6 0 |
| 65.4e-008 | - | <u>gi 1586344 prf 2203411A</u> reeler gene [Mus musculus] | <u>10</u> | 5.7 | 99.3 7 |
| 73.0e-008 | - | <u>gi 4503165 ref NP_003581.1 </u> cullin 3 | <u>16</u> | 9.0 | 88.9 1 |
| + | | | | | |
| 81.4e-008 | - | <u>gi 6681275 ref NP_031934.1 </u> eukaryotic elongation factor-2 kinase | <u>14</u> | 5.2 | 81.7 2 |
| - | - | <u>gi 6978795 ref NP_037079.1 </u> eukaryotic elongation factor 2 kinase | <u>9</u> | 5.1 | 81.4 7 |
| 91.2e-008 | - | <u>gi 7662434 ref NP_055733.1 </u> KIAA0990 protein | <u>15</u> | 9.5 | 91.7 1 |
| 5.2e-009 | - | <u>gi 7662436 ref NP_055749.1 </u> KIAA0996 protein | <u>13</u> | 5.8 | 96.6 |

1
0

NOTE:

1. To search again using unmatched masses, click the symbol @.
2. Highly similar protein sequences were given the same rank (IE user: click "+" to expand/contract).

Input Summary

Date & Time Wed Feb 07 10:07:52 2001 UTC (Search Time: 5.88 sec.)

Sample ID EDB Fibronectin, #0824, Bande 7

Database NCBI nr [..\databases\nr]

Taxonomy Catego- Mammalia (mammals)

ry

Prote- 80 - 100 kDa

in Mass Range

Protein pI Range 0.0 -14.0

Search for Single protein only

Digest Chemistry Trypsin

Max Missed Cut 2

Modifications +C3H5ON@C(Partial); +O@M(Partial);

Charge State MH+

Peptide Masses

(Da,Average)

Tolerance(AVG) 1.00 ppm

881.213 983.479 1222.615 1266.561 1376.698 1422.672 1473.821 1479.786

Peptide Masses

(Da,Monoisotopic)

1553.850 1567.725 1639.856 1781.886 1819.830 1915.945 1931.961

1961.051 2019.150 2068.101 2224.061 2283.101 2344.093 2470.201

2501.215 2705.264 2776.358 2840.545 2872.558 3052.493 3143.494

3159.559 3280.571 3298.572

Tolerance(MON) 50.00 ppm

Number of Pepti- 32

des

- 5 ProteoMetrics' ProFound is based on ProFound at The Rockefeller University [search + transmission time: >=5.91 sec]

SEQUENZPROTOKOLL

<110> Schering AG

5 <120> Rezeptor der ED_b-Fibronectin-Domäne

<130> s5495

<140>

10 <141>

<160> 4

<170> PatentIn Ver. 2.1

15

<210> 1

<211> 15

<212> PRT

20 <213> Bindungssequenz Nr. I für den putativen EDB-Rezeptor auf dem EDB-Molekül

<400> 1

Val Asp Ile Thr Asp Ser Ser Ile Gly Leu Arg Trp Thr Pro Leu

1 5 10 15

25

<210> 2

<211> 15

30 <212> PRT

<213> Bindungssequenz Nr. II für den putativen EDB-Rezeptor auf dem EDB-Molekül

<400> 2

Gly Tyr Tyr Thr Val Thr Gly Leu Glu Pro Gly Ile Asp Tyr Asp
 1 5 10 15

5

<210> 3

<211> 15

<212> PRT

<213> Bindungssequenz Nr. III für den putativen EDB-Rezeptor auf dem EDB-
 10 Molekül

<400> 3

Thr Gly Leu Glu Pro Gly Ile Asp Tyr Asp Ile Ser Val Ile Thr
 1 5 10 15

15

<210> 4

<211> 91

20 <212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 4

Glu Val Pro Gln Leu Thr Asp Leu Ser Phe Val Asp Ile Thr Asp Ser
 25 1 5 10 15

Ser Ile Gly Leu Arg Trp Thr Pro Leu Asn Ser Ser Thr Ile Ile Gly
 20 25 30

30 Tyr Arg Ile Thr Val Val Ala Ala Gly Glu Gly Ile Pro Ile Phe Glu
 35 40 45

Asp Phe Val Asp Ser Ser Val Gly Tyr Tyr Thr Val Thr Gly Leu Glu
 50 55 60

Pro Gly Ile Asp Tyr Asp Ile Ser Val Ile Thr Leu Ile Asn Gly Gly

65

70

75

80

5 Glu Ser Ala Pro Thr Thr Leu Thr Gln Gln Thr

85

90

Patentansprüche

5 1. Ein Protein,

- 10
- a) das die Fähigkeit aufweist, spezifisch an die ED_b-Fibronectin-Domäne zu binden;
 - b) das spezifisch in Endothelzellen exprimiert oder aktiviert ist;
 - c) das spezifisch in stromalen Zellen eines Tumors exprimiert oder aktiviert ist;
 - d) das spezifisch in Tumorzellen exprimiert oder aktiviert ist;
 - e) dessen Bindung an die ED_b-Fibronectin-Domäne durch ein Polypeptid inhibiert wird; und
 - 15 f) das ein apparentes Molekulargewicht von 120 – 130 kDa für die leichte Kette und 150 – 160 kDa für die schwere Kette, ermittelt durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese, aufweist.

2. Ein Protein, gemäß Anspruch 1,

- 20
- a) das die Fähigkeit aufweist, spezifisch an die ED_b-Fibronectin-Domäne zu binden, wobei die Bindungsregion durch mindestens eine Sequenz charakterisiert ist, die ausgewählt ist aus der Gruppe, die SEQ ID NO:1 - 3 umfaßt;

- b) das spezifisch in Endothelzellen exprimiert oder aktiviert ist;
- c) das spezifisch in stromalen Zellen eines Tumors exprimiert oder aktiviert ist;
- d) das spezifisch in Tumorzellen exprimiert oder aktiviert ist;
- 5 e) dessen Bindung an die ED_b-Fibronectin-Domäne durch ein Polypeptid inhibiert wird, das eine Sequenz umfaßt, die ausgewählt ist aus der Gruppe, die SEQ ID NO:1 - 3 umfaßt; und
- f) das ein apparentes Molekulargewicht von 120 – 130 kDa für die leichte Kette und 150 – 160 kDa für die schwere Kette, ermittelt durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese, aufweist.

10 3. Ein Protein, gemäß den Ansprüchen 1 bis 2,

- a) das die Fähigkeit aufweist, spezifisch an die ED_b-Fibronectin-Domäne zu binden, und das die $\alpha 2\beta 1$ -Kette des Integrins umfaßt;
- b) das spezifisch in Endothelzellen exprimiert oder aktiviert ist;
- 15 c) das spezifisch in stromalen Zellen eines Tumors exprimiert oder aktiviert ist;
- d) das spezifisch in Tumorzellen exprimiert oder aktiviert ist;
- e) dessen Bindung an die ED_b-Fibronectin-Domäne durch ein Polypeptid inhibiert wird, und das die α -Kette des Integrins umfaßt; und

f) das ein apparentes Molekulargewicht von 120 – 130 kDa für die leichte Kette und 150 – 160 kDa für die schwere Kette, ermittelt durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese, aufweist.

4. Protein gemäß den Ansprüchen 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß die Endothelzellen proliferierende Endothelzellen sind.

5. Protein, dessen spezifische Bindung an die ED_b-Fibronectin-Domäne die Adhäsion von Endothelzellen, Tumor-Stroma-Zellen und Tumorzellen vermittelt.

6. Protein, dessen spezifische Bindung an die ED_b-Fibronectin-Domäne die Adhäsion von Endothelzellen, Tumor-Stroma-Zellen und Tumorzellen vermittelt, wobei die Bindungsregion durch mindestens eine Sequenz charakterisiert ist, die ausgewählt ist aus der Gruppe, die SEQ ID NO:1 - 3 umfaßt.

7. Protein gemäß Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß Die Bindungsregion die $\alpha 2\beta 1$ -Kette des Integrins umfaßt.

8. Protein, dessen spezifische Bindung an die ED_b-Fibronectin-Domäne die Proliferation von Endothelzellen induziert.

9. Protein, dessen spezifische Bindung an die ED_b-Fibronectin-Domäne die Proliferation von Endothelzellen induziert, wobei die Bindungsregion durch mindestens eine Sequenz charakterisiert ist, die ausgewählt ist aus der Gruppe, die SEQ ID NO:1 - 3 umfaßt.

10. Protein gemäß Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß die Bindungsregion die $\alpha 2\beta 1$ -Kette des Integrins umfaßt.

11. Protein, dessen spezifische Bindung an die ED_b-Fibronectin-Domäne die Proliferation, Migration und Differenzierung von Endothelzellen in eine Collagenmatrix induziert.

12. Protein, dessen spezifische Bindung an die ED_b-Fibronectin-Domäne die Proliferation, Migration und Differenzierung von Endothelzellen in eine Collagenmatrix induziert, wobei die Bindungsregion durch mindestens eine Sequenz charakterisiert ist, die ausgewählt ist aus der Gruppe, die SEQ ID NO:1 - 3 umfaßt;

13. Protein gemäß Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, daß die Bindungsregion die $\alpha 2\beta 1$ -Kette des Integrins umfaßt.

14. Protein, das an die ED_b-Fibronectin-Domäne bindet und spezifische Signaltransduktionswege induziert, wobei mindestens ein Gen induziert wird, das für ein Protein codiert, das ausgewählt ist aus der Gruppe, die

- Fokale Adhäsionskinase,
- CD6-Ligand (ALCAM),
- die α -Kette des Vitronectin-Rezeptors,
- die integrieret alpha 8 Untereinheit und
- einen/den Vorläufer für Follistatin-verwandtes Protein umfaßt.

15. Protein, das an die ED_b-Fibronectin-Domäne bindet und spezifische Signaltransduktionswege induziert, wobei mindestens ein Gen induziert wird, das für ein Protein codiert, das ausgewählt ist aus der Gruppe, die

- Fokale Adhäsionskinase,
- CD6-Ligand (ALCAM),
- die α -Kette des Vitronectin-Rezeptors,
- die integrieret alpha 8 Untereinheit und
- einen/den Vorläufer für Follistatin-verwandtes Protein umfaßt,

und wobei die Bindungsregion durch mindestens eine Sequenz charakterisiert ist, die ausgewählt ist aus der Gruppe, die SEQ ID NO:1 - 3 umfaßt.

16. Protein gemäß Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, daß die Bindungsregion die $\alpha 2\beta 1$ -Kette des Integrins umfaßt.

17. Antikörper, der in der Lage ist, an ein Protein nach einem der Ansprüche 1-10 zu binden.

5

18. Antikörper, der in der Lage ist, an ein Protein zu binden, das eine Aminosäuresequenz umfaßt, die aus der Gruppe ausgewählt ist, die SEQ ID NO:1 - 4 umfaßt.

10

19. Antikörper nach einem der Ansprüche 17 - 18, der in der Lage ist, Effekte zu inhibieren, die für die ED_b-Fibronectin-Domäne spezifisch sind.

20. Antikörper nach einem der Ansprüche 17 - 18, wobei die Bindung und Inhibition in vitro und/oder in vivo erfolgt.

15

21. Antikörper, nach einem der Ansprüche 17 - 20, dadurch gekennzeichnet, daß er monoklonal oder rekombinant ist.

20

22. Antikörper, nach einem der Ansprüche 17 - 21, dadurch gekennzeichnet, daß er ein scFv-Fragment ist.

23. Zelle, die ein Protein nach einem der Ansprüche 1 - 10 exprimiert.

24. Zelle, die einen Antikörper nach einem der Ansprüche 17 - 22 exprimiert.

25

25. Phage, der einen Antikörper nach einem der Ansprüche 17 - 22 exprimiert.

26. Verfahren zum Screenen auf Verbindungen, die an einen Rezeptor der ED_b-Fibronectin-Domäne binden, wobei das Verfahren umfaßt:

30

Vergleich einer Antwort von Zellen in Anwesenheit von einer oder mehreren dieser Verbindungen mit der Kontrollantwort besagter Zellen in Abwesenheit dieser Verbindungen, wobei die Zellen

ein Protein nach einem der Ansprüche 1 – 10 exprimieren oder

eine Nukleinsäure, die für dieses Protein codiert, umfassen, und

5

wobei die Antwort bzw. die Kontrollantwort durch einen Rezeptor der ED_b-Fibronectin-Domäne vermittelt wird.

10

27. Verfahren nach Anspruch 26, wobei die Antwort bzw. die Kontrollantwort das Anhaften der Zellen an Oberflächen umfaßt, die mit der ED_b - Fibronectin-Domäne oder Teilen davon beschichtet sind.

15

28. Verfahren nach einem der Ansprüche 26 – 27, dadurch gekennzeichnet, daß eine Bindungsregion der ED_b - Fibronectin-Domäne die Sequenzen SEQ ID NO: 1 – 4 umfaßt oder Teile davon.

20

29. Verfahren nach Anspruch 26, dadurch gekennzeichnet, daß die Antwort bzw. die Kontrollantwort die Proliferation der Zellen an Oberflächen umfaßt, die mit der ED_b-Fibronectin-Domäne oder Teilen davon beschichtet sind.

25

30. Verfahren nach Anspruch 26, dadurch gekennzeichnet, daß die Antwort bzw. die Kontrollantwort die Proliferation, Migration und Differenzierung von Endothelzellen in einer Collagenmatrix umfaßt, die mit der ED_b - Fibronectin-Domäne oder Teilen davon versetzt wird.

30

31. Verfahren nach einem der Ansprüche 26 – 30, wobei die Verbindungen ausgewählt sind aus der Gruppe, die Antikörper, artifizielle Antikörper, Antikörperfragmente, Peptide, niedermolekulare Verbindungen, Aptamere und Spiegelmere umfaßt.

32. Verfahren nach Anspruch 31, dadurch gekennzeichnet, daß die Antikörper rekombinante Antikörper sind.

33. Verfahren nach Anspruch 31, dadurch gekennzeichnet, daß die Antikörper ausgewählt sind aus der Gruppe, die scFv und Fragmente davon umfaßt.

34. Verfahren zum Screenen auf Verbindungen, die an die ED_b-Fibronectin-Domäne binden, wobei das Verfahren umfaßt:

a) In Kontakt-Bringen von Zellen mit einer festgelegten Konzentration eines Proteins, das die ED_b-Fibronectin-Domäne oder ein Protein mit einer der in SEQ ID NO:1 – 4 dargestellten Sequenzen umfaßt, in der Anwesenheit verschiedener Konzentrationen von einer oder mehrerer Verbindungen; und

b) Nachweisen von Unterschieden in der Antwort der Zellen auf das Protein, das die ED_b-Fibronectin-Domäne oder ein Protein mit einer der in SEQ ID NO: 1-4 dargestellten Sequenzen umfaßt, in der Anwesenheit der Verbindungen im Vergleich mit der Kontrollantwort der Zellen auf das Protein, das die ED_b-Fibronectin-Domäne oder ein Protein mit einer der in SEQ ID NO: 1-4 dargestellten Sequenzen umfaßt, in der Abwesenheit dieser Verbindungen, wobei

die Zellen ein Protein nach einem der Ansprüche 1 – 10 exprimieren oder

eine Nukleinsäure, die für dieses Protein codiert, umfassen,

und wobei die Antwort bzw. die Kontrollantwort durch einen Rezeptor der ED_b-Fibronectin-Domäne vermittelt wird.

35. Verfahren nach Anspruch 34, wobei die Antwort bzw. die Kontrollantwort das Anhaften der Zellen an Oberflächen umfaßt, die mit der ED_b-Fibronectin-Domäne oder Teilen davon beschichtet sind.

36. Verfahren nach Anspruch 34, dadurch gekennzeichnet, daß die Antwort bzw. die Kontrollantwort die Proliferation der Zellen an Oberflächen umfaßt, die mit der ED_b - Fibronectin-Domäne oder Teilen davon beschichtet sind.
- 5 37. Verfahren nach Anspruch 34, dadurch gekennzeichnet, daß die Antwort bzw. die Kontrollantwort die Proliferation, Migration und Differenzierung von Endothelzellen in einer Collagenmatrix umfaßt, die mit der ED_b - Fibronectin-Domäne oder Teilen davon versetzt wird.
- 10 38. Verfahren nach einem der Ansprüche 34 – 37, wobei die Verbindungen ausgewählt sind aus der Gruppe, die Antikörper, artifizielle Antikörper, Antikörperfragmente, Peptide, niedermolekulare Substanzen, Aptamere und Spiegelmere umfaßt.
- 15 39. Verwendung einer Nukleinsäure, die für ein Protein codiert, das eine Sequenz umfaßt, die ausgewählt ist aus der Gruppe, die SEQ ID NO: 1 - 4 umfaßt, zum Screenen auf Verbindungen, die an einen Rezeptor der ED_b - Fibronectin-Domäne oder die ED_b - Fibronectin-Domäne binden.
- 20 40. Verwendung eines Proteins nach einem der Ansprüche 1 – 10 bzw. eines Antikörpers nach einem der Ansprüche 17 – 22 zum Screenen auf Verbindungen, die an einen Rezeptor der ED_b - Fibronectin-Domäne oder die ED_b - Fibronectin-Domäne binden.
- 25 41. Verwendung einer Zelle nach einem der Ansprüche 23 – 24, zum Screenen auf Verbindungen, die an einen Rezeptor der ED_b - Fibronectin-Domäne oder die ED_b - Fibronectin-Domäne binden.
- 30 42. Verwendung einer Nukleinsäure, die für ein Protein codiert, das eine Sequenz umfaßt, die ausgewählt ist aus der Gruppe, die SEQ ID NO: 1 - 4 umfaßt, zum Entwickeln von Antikörpern oder scFv-Fusionsproteinen für diagnostische oder therapeutische Zwecke

43. Verwendung eines Proteins nach einem der Ansprüche 1 – 10 zum Entwickeln von Antikörpern oder scFv–Fusionsproteinen für diagnostische oder therapeutische Zwecke.
- 5 44. Verwendung einer Zelle nach einem der Ansprüche 23 – 24 zum Entwickeln von Antikörpern oder scFv–Fusionsproteinen für diagnostische oder therapeutische Zwecke.
- 10 45. Verwendung eines Phagen nach Anspruch 25 zum Entwickeln von Antikörpern oder scFv–Fusionsproteinen für diagnostische oder therapeutische Zwecke.
- 15 46. Verwendung eines Proteins, das eine Sequenz umfaßt, die ausgewählt ist aus der Gruppe, die SEQ ID NO: 1 - 4 umfaßt, für eine pro-angiogene Therapie.
47. Verwendung eines Proteins, das eine Sequenz umfaßt, die ausgewählt ist aus der Gruppe, die SEQ ID NO: 1 - 4 umfaßt, für diagnostische Zwecke.
- 20 48. Verwendung eines Proteins, das eine Sequenz umfaßt, die ausgewählt ist aus der Gruppe, die SEQ ID NO: 1 - 4 umfaßt, in der Gentherapie.
- 25 49. Verwendung eines Proteins, das eine Sequenz umfaßt, die ausgewählt ist aus der Gruppe, die SEQ ID NO: 1 - 4 umfaßt, zum Beschichten von Oberflächen, an die Endothelzellen binden
50. Verwendung nach Anspruch 49, dadurch gekennzeichnet, daß das Beschichten in vitro oder in vivo erfolgt.
- 30 51. Verwendung eines Proteins, das eine Sequenz umfaßt, die ausgewählt ist aus der Gruppe, die SEQ ID NO: 1 - 4 umfaßt, in Zellkulturen.

52. Verwendung eines Proteins, das eine Sequenz umfaßt, die ausgewählt ist aus der Gruppe, die SEQ ID NO: 1 - 4 umfaßt, zusammen mit mindestens einem Transplantat.
- 5 53. Verwendung nach Anspruch 52, dadurch gekennzeichnet, daß das Transplantat ausgewählt ist aus der Gruppe, die Gefäß(e), Haut, Cornea, Nieren, Leber, Knochenmark, Herz, Lungen, Knochen, Thymus, Dünndarm, Pankreas, andere innere Organe sowie Teile und Zellen davon umfaßt.
- 10 54. Verwendung eines Proteins, das eine Sequenz umfaßt, die ausgewählt ist aus der Gruppe, die SEQ ID NO: 1 - 4 umfaßt, zusammen mit mindestens einem Implantat.
- 15 55. Verwendung nach Anspruch 54, dadurch gekennzeichnet, daß das Implantat ausgewählt ist aus der Gruppe, die Lungenimplantate, künstliche Herzschrittmacher, künstliche Herzklappen, Gefäßimplantate, Endoprothesen, Schrauben, Schienen, Platten, Drähte, Nägel, Stäbe, künstliche Gelenke, Mammaplantate, künstliche Schädelplatten, künstliche Zähne, Zahnfüllungen und Zahnbrücken umfaßt.

Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft ein Protein, das spezifisch an die ED_b-Fibronektin-Domäne bindet, Verfahren zum Screenen auf Verbindungen, die an einen Rezeptor der

- 5 ED_b-Fibronektin-Domäne oder an die ED_b-Fibronektin-Domäne selbst binden, sowie die Verwendungen des Proteins.

Bezeichnung

| | | | | |
|------------|---|------|---|---|
| Fn-7-B-8-9 | 7 | ED-B | 8 | 9 |
|------------|---|------|---|---|

| | | | |
|----------|---|---|---|
| Fn-7-8-9 | 7 | 8 | 9 |
|----------|---|---|---|

| | |
|------|------|
| ED-B | ED-B |
|------|------|

| | |
|-------|----|
| Fn-10 | 10 |
|-------|----|

| | |
|------|---|
| Fn-6 | 6 |
|------|---|

Fig. 1

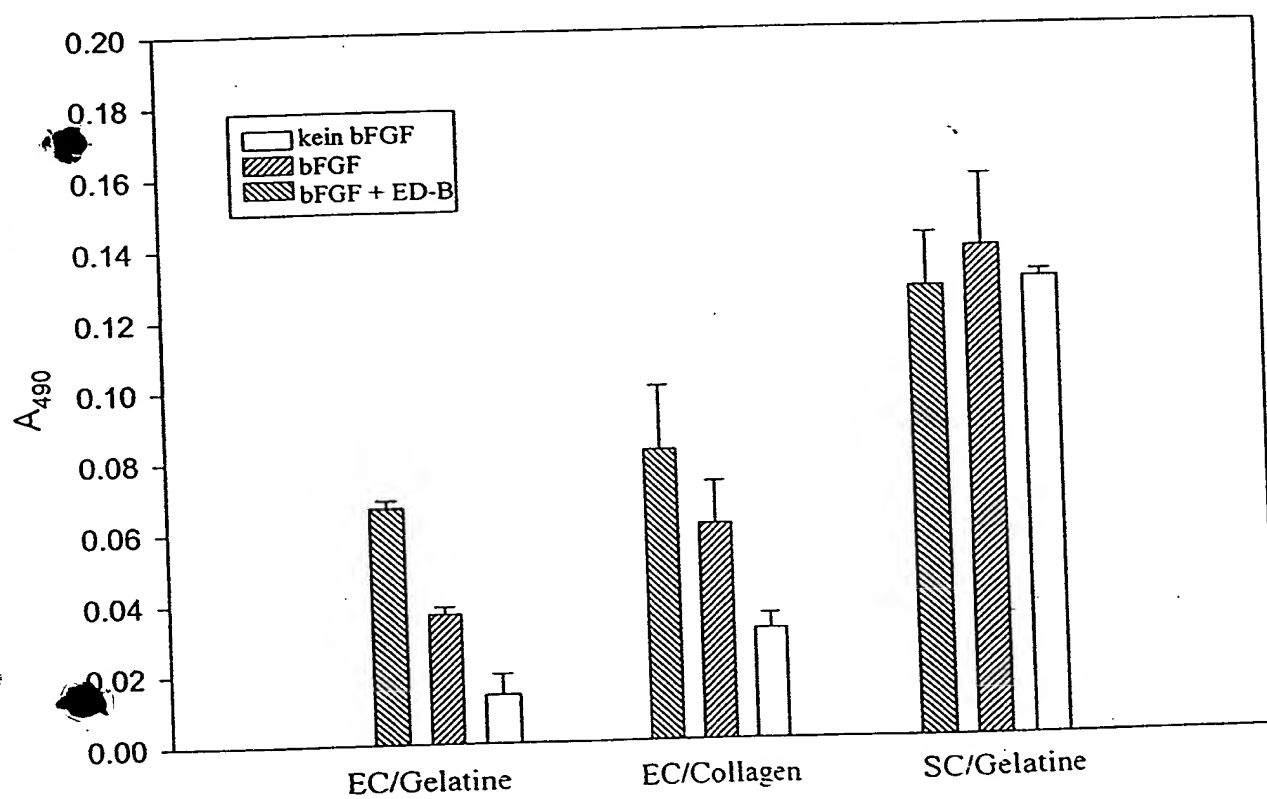


Fig. 2

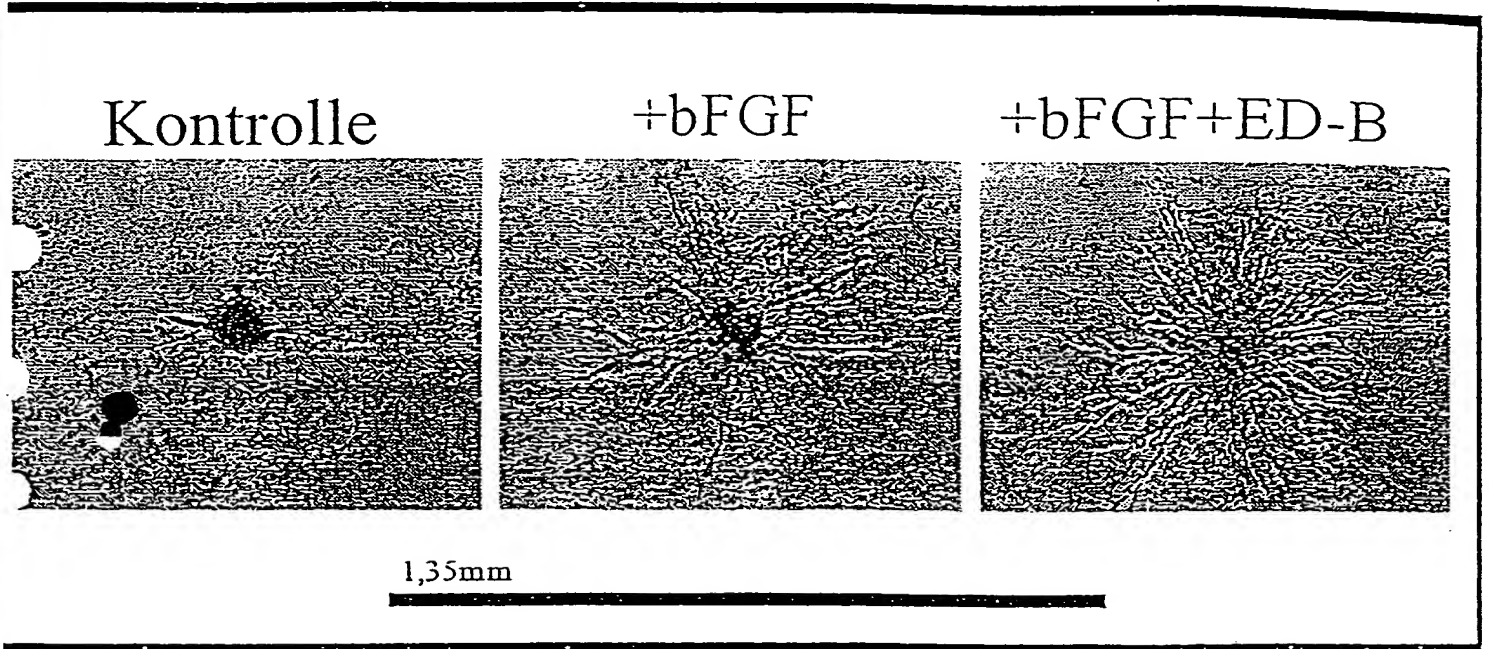


Fig. 3

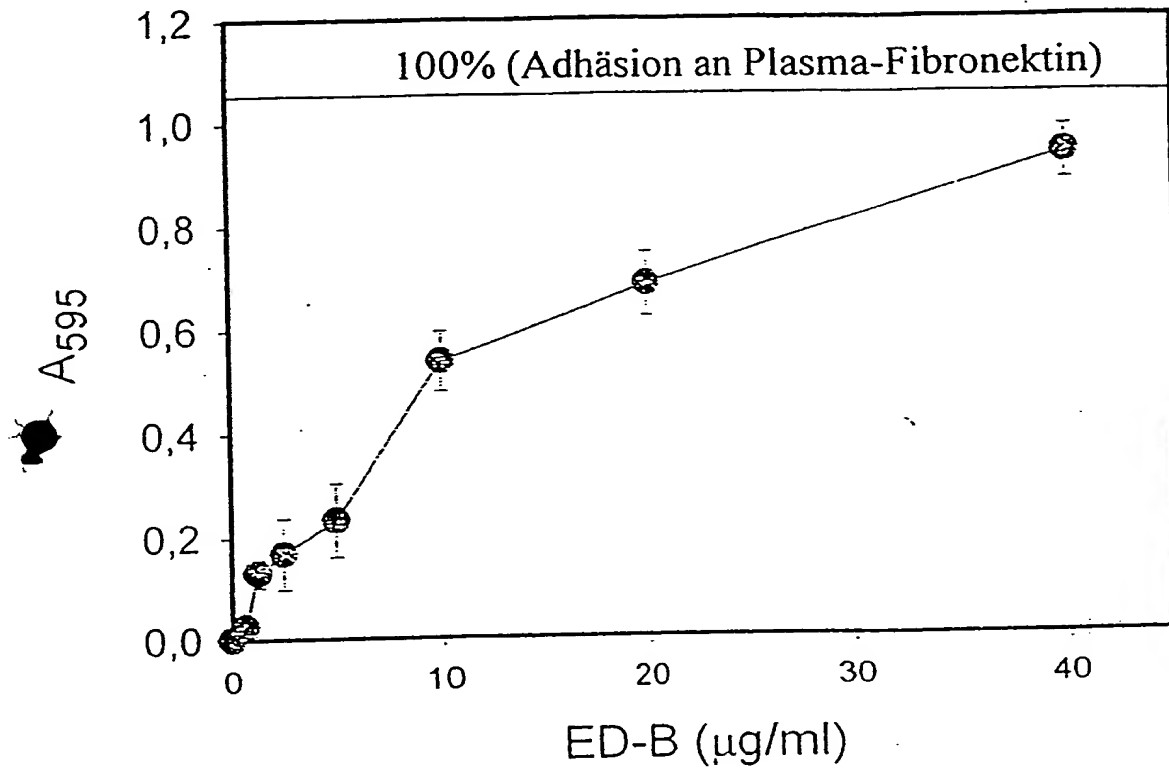
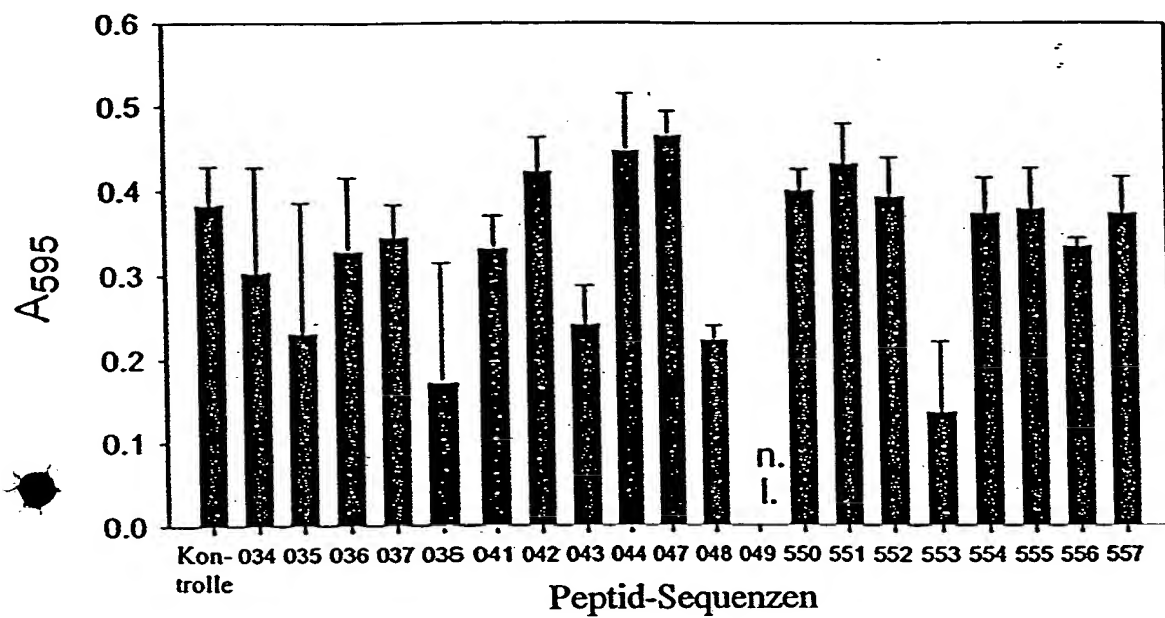


Fig. 4



n. l. = nicht löslich

Fig. 5

| | | |
|---|------|-------|
| EVPQLTDLSEVDITDSSIGLRWTPLNSSTIIGYRITVVAAGEGIP | 041 | |
| FEDFVDSSVGYYTVTGLEPGIDYDISVITLINGESAPTTLTQOT | 042 | |
| DTIIEVPQLTDLSE | 034 | |
| EVPQLTDLSEVDITD | 043 | |
| TDLSEVDITDSSIGL | 044 | |
| VDITDSSIGLRWTPL | 047 | |
| ITDSSIGLRWTPL | 048 | |
| SSIGLRWTPLNSSTI | 049 | n. l. |
| RWTPLNSSTIIGYRI | 550* | |
| NSSTIIGYRITVVA | 035 | |
| IGYRITVVAAGEGIP | 036 | |
| TVVAAGEGIPFEDF | 551* | |
| GEGIPFEDFVDSSV | 037 | |
| IFEDFVDSSVGYYTV | 552 | |
| FEDFVDSSV | 553 | |
| VDSSVGYYTVTGLEP | 038 | |
| GGYYTVTGLEPGIDYD | 554* | |
| TGLEPGIDYDISVIT | 555* | |
| GIDYDISVITLINGG | 556 | |
| ISVITLINGESAPT | 557 | |
| LINGGESAPTTLTQ | | |
| ESAPTTLTQQTAVPP | | |

* löslich in DMSO
n. l. = nicht löslich

Fig. 6

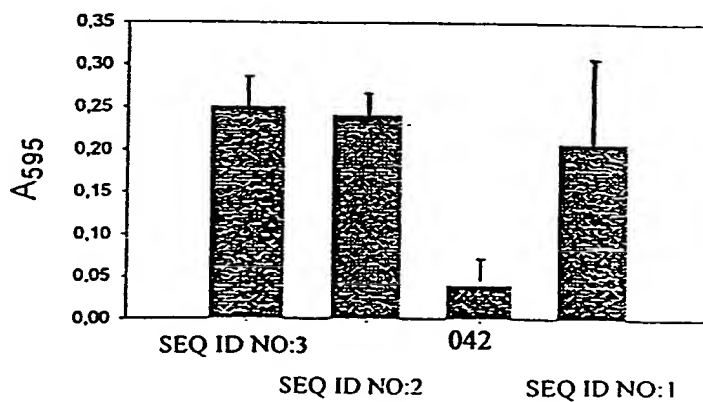


Fig. 7

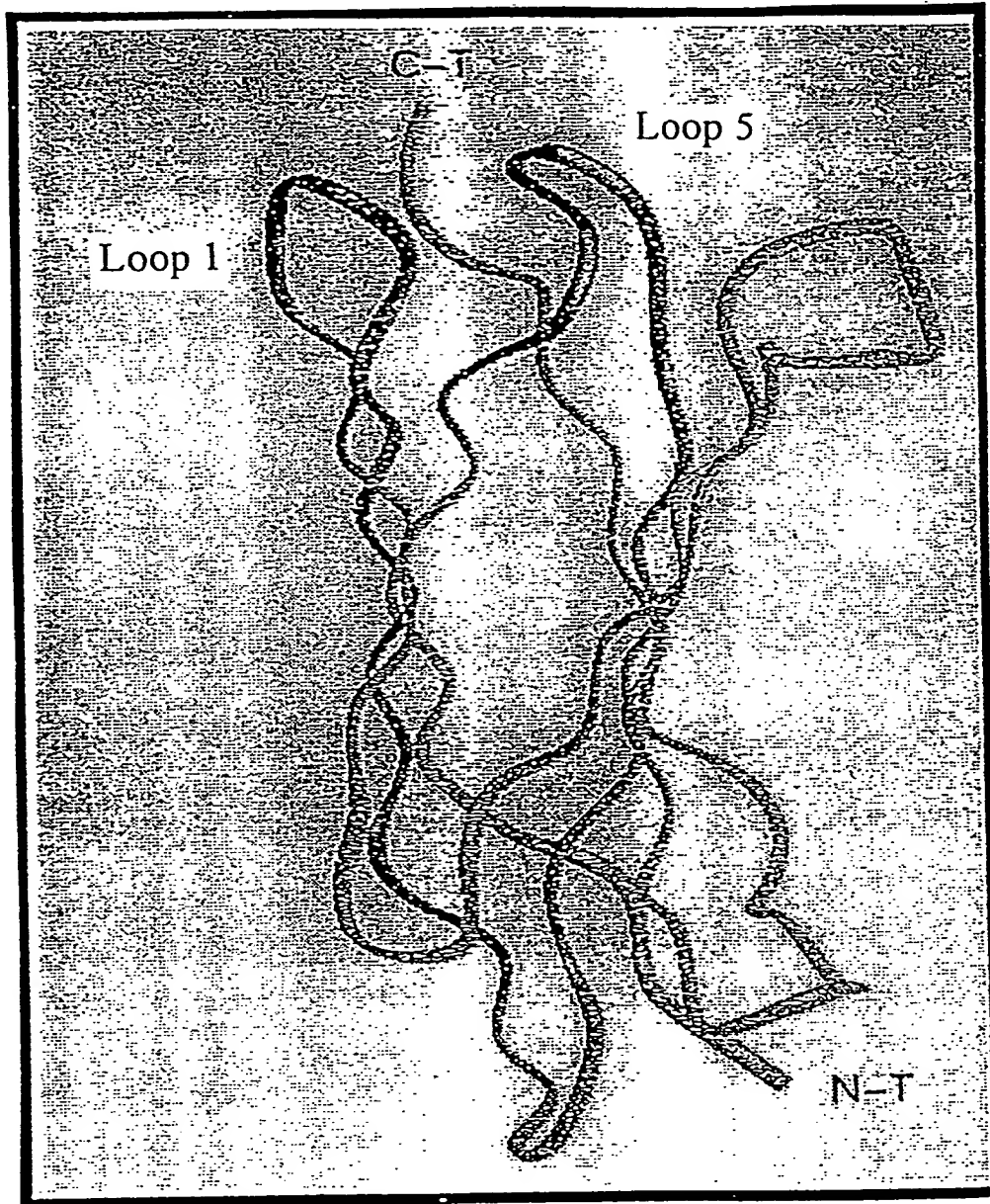


Fig. 8

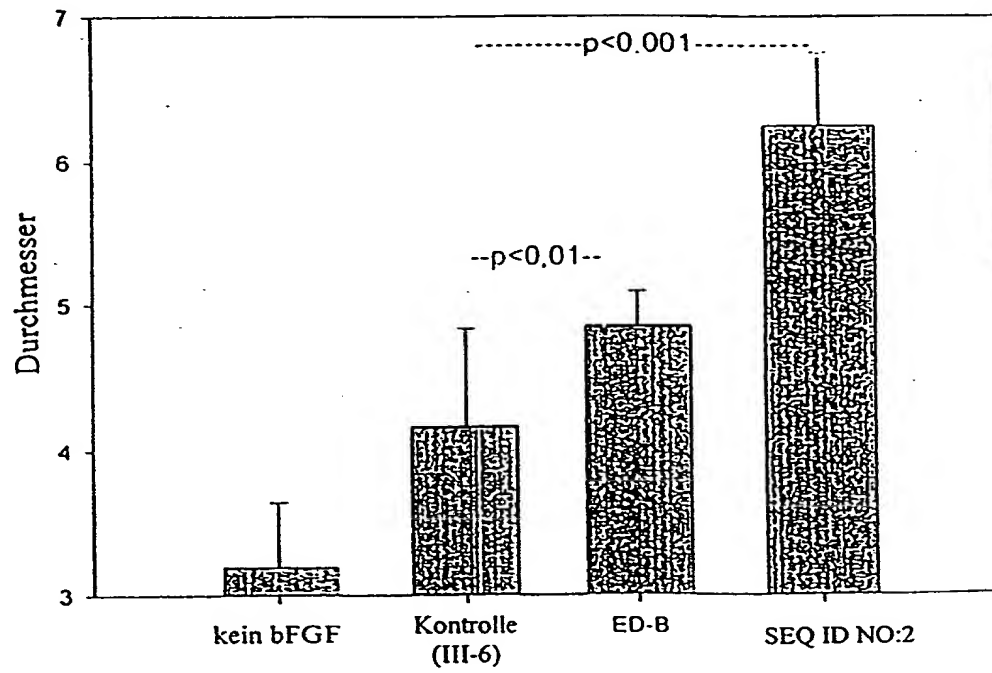


Fig. 9

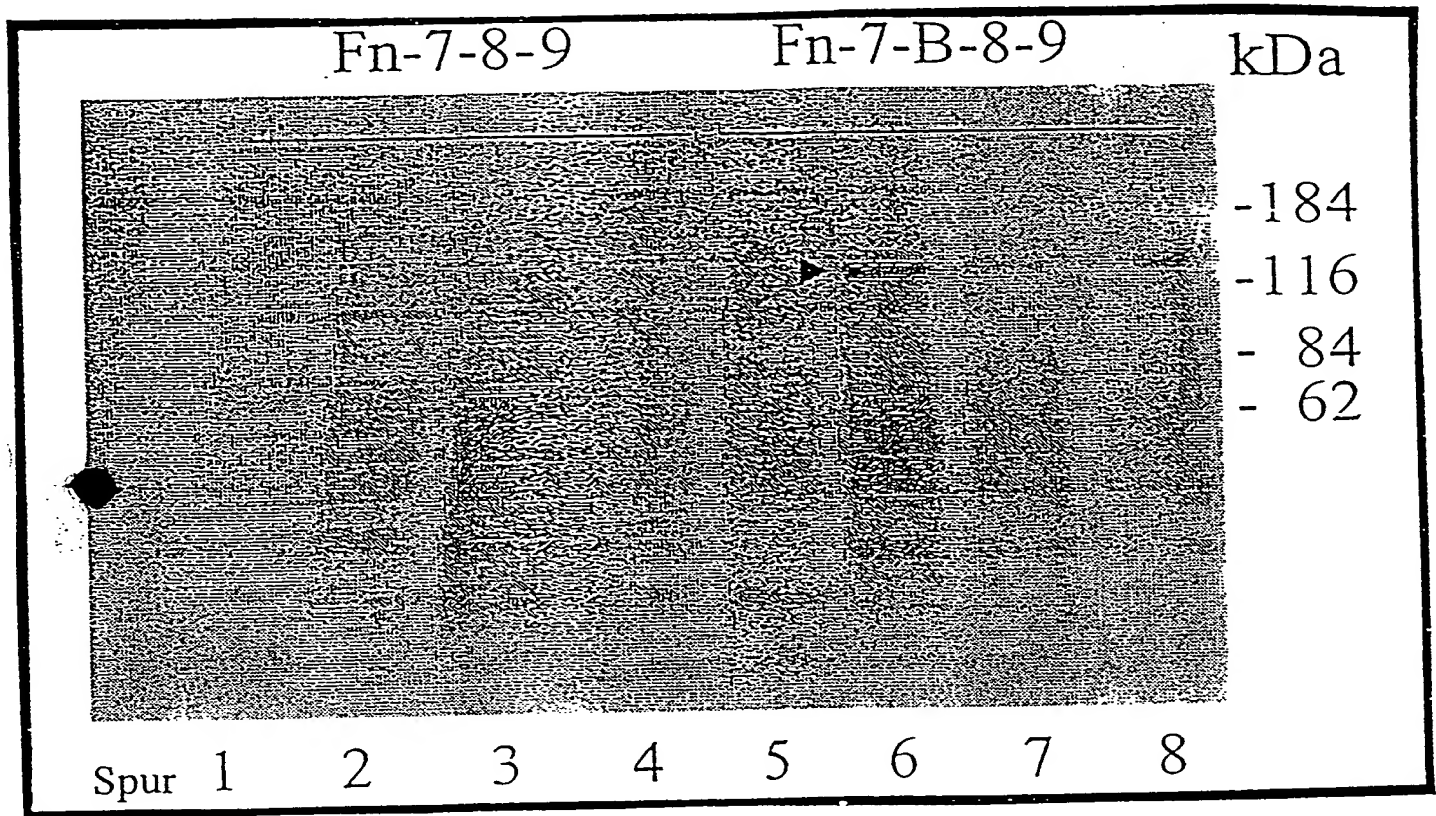


Fig. 10

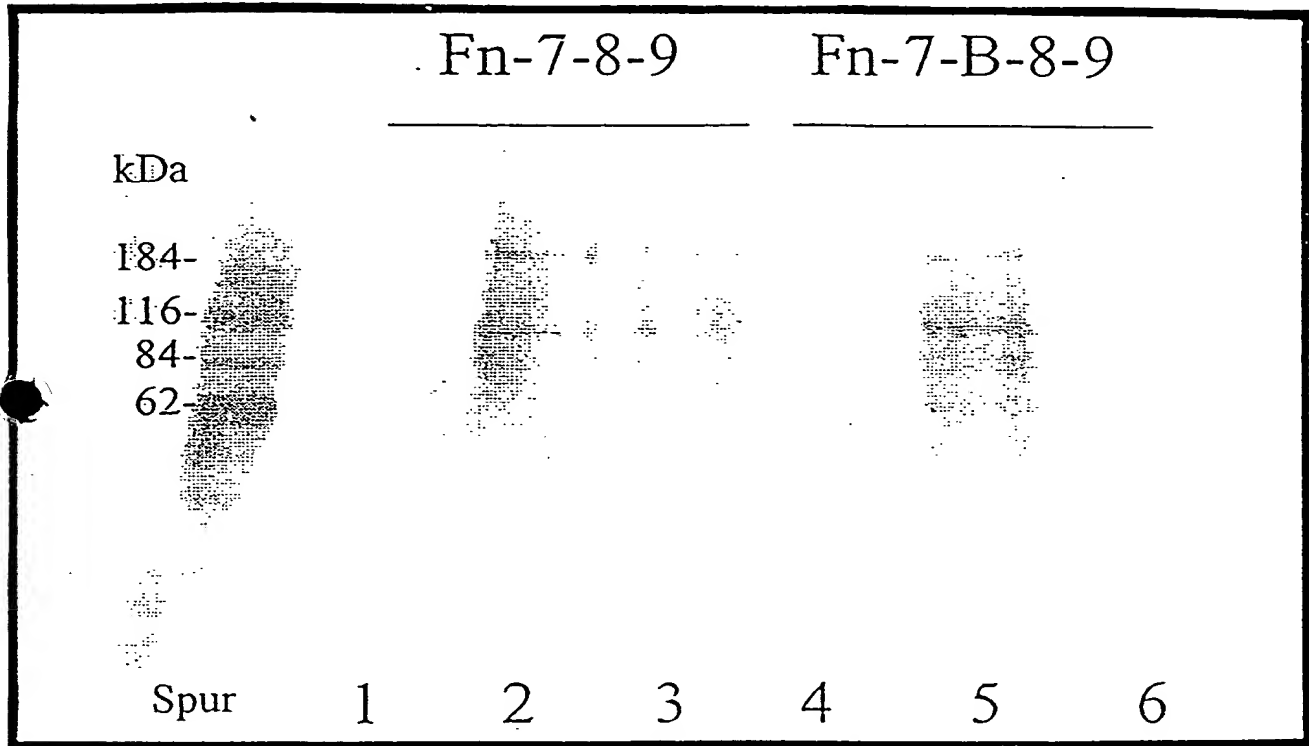


Fig. 11

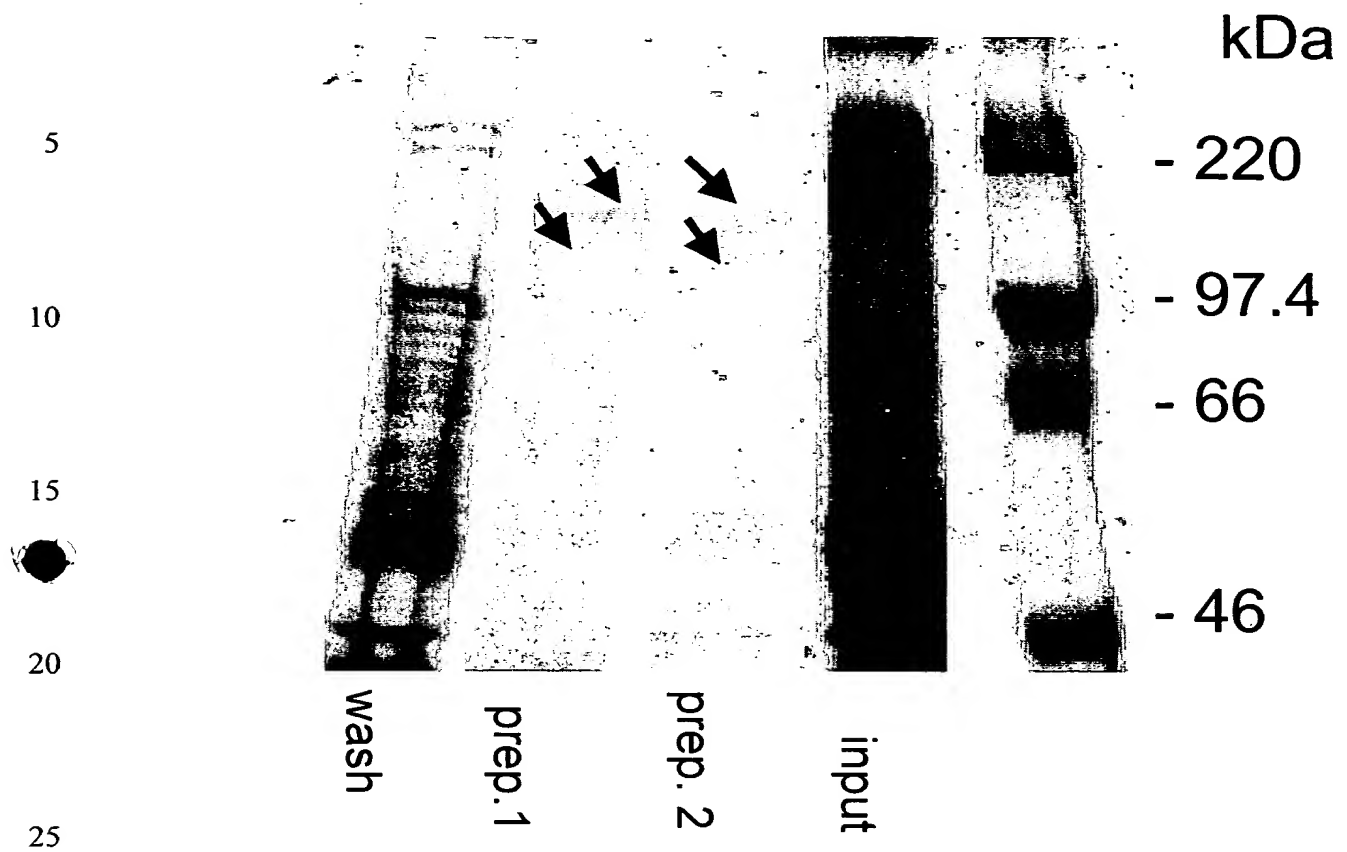


Fig. 12

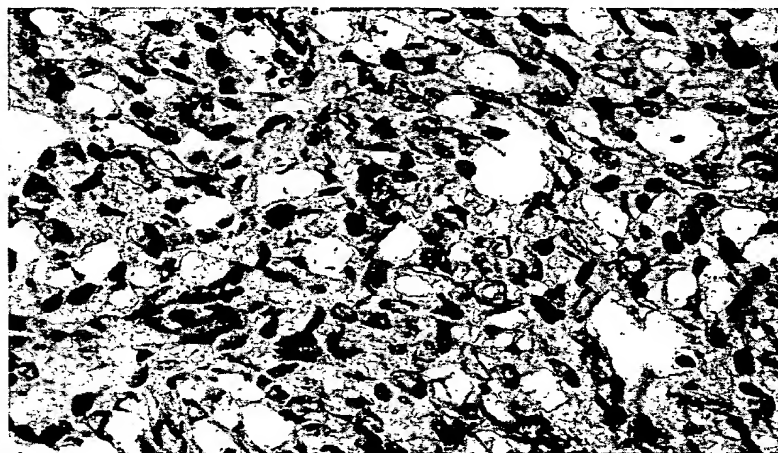
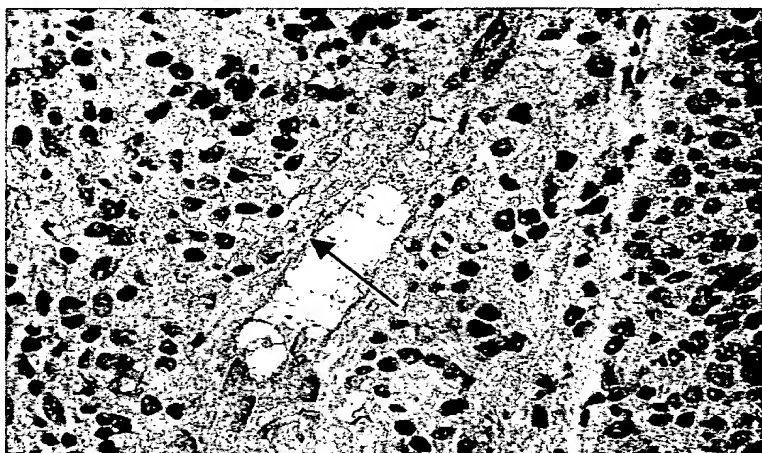
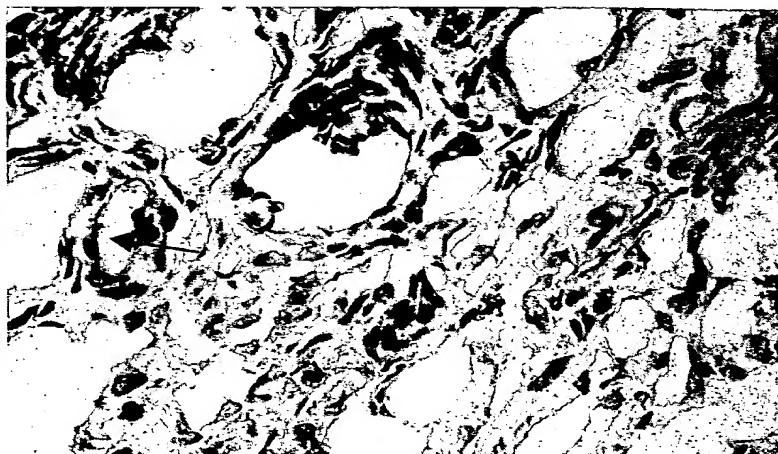
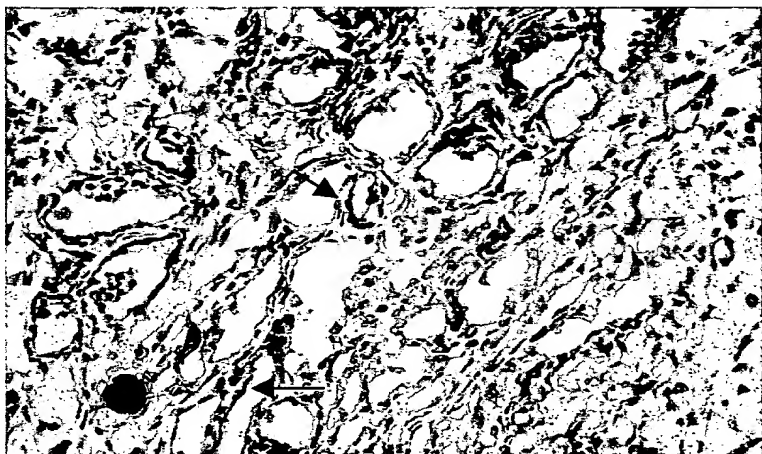


Fig. 13